

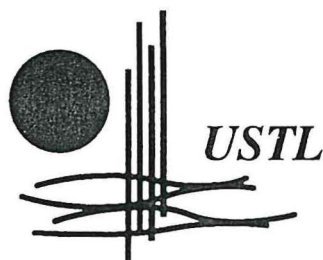
Mémoire de fin d'études pour l'obtention du DESS
Génie Cellulaire et Moléculaire

**DÉTECTION DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CITRI*,
AGENT DU CHANCRE BACTERIEN DES AGRUMES,
PAR NESTED-PCR :**

- Optimisation de la technique et mise au point d'un protocole quantitatif,
- Application dans le cadre d'une étude d'écologie microbienne.

Présenté par
Isabelle VILLEMOT

Responsable de stage : **Olivier PRUVOST**
Soutenu le 20 Septembre 1994 à l'USTL



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du DESS
Génie Cellulaire et Moléculaire

**DÉTECTION DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CITRI*,
AGENT DU CHANCRE BACTERIEN DES AGRUMES,
PAR NESTED-PCR :**

- Optimisation de la technique et mise au point d'un protocole quantitatif,
- Application dans le cadre d'une étude d'écologie microbienne.

Présenté par
Isabelle VILLEMOT

Responsable de stage : **Olivier PRUVOST**
Soutenu le 20 Septembre 1994 à l'USTL

AVANT-PROPOS

Ce stage s'est déroulé au laboratoire de phytopathologie du CIRAD-FLHOR de Saint Pierre du 7 mars au 15 septembre 1994.

Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui ont contribuées à faire de ce stage une formidable expérience :

- Olivier qui par sa motivation et son dynamisme a rendu ce travail passionnant. Sa présence et son aide jusqu'au dernier moment font de lui un excellent maître de stage (normal, c'est un ancien universitaire lillois !!).

- John Hartung, chercheur de l'USDA de Beltsville aux Etats Unis avec la collaboration duquel ce travail a été réalisé. Ses conseils en début de stage m'ont été très utiles par la suite.

- Ninie ma petite complice avec qui j'ai passé des moments formidables et qui a toujours été là pour m'aider.

- Liolio mon voisin de laboratoire un peu râleur mais trognon quand même qui a toujours été de bons conseils pour mon travail et mon mémoire.

- Jean-Jacques et Francis sans lesquels l'ambiance au laboratoire n'aurait pas été aussi joyeuse.

- Elisabeth et Marie-Rose pour leur aide et leur bonne humeur.

Je n'oublierai pas la bande de stagiaires et de VAT pour tous les bons moments passés ensemble ainsi que mes colocatrices de la "case de passage", Cri-Cri, Valoch et Cacou pour ces 6 mois de cohabitation sans oublier Pierrot qui nous a supporté les premiers mois. A Serge enfin, qui m'a fait découvrir sa belle île et ses spécialités et sans lequel je n'aurais pas eu tant de peine à partir.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	2
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. L'hôte : les agrumes	3
1.1 Définition et répartition géographique.....	3
1.2 Production mondiale	3
2. La maladie : le chancre bactérien des agrumes	3
2.1 Répartition géographique et origine	3
2.2 Importance économique.....	4
2.3 Symptomatologie	4
2.4 Épidémiologie	4
2.4.1 l'infection	4
2.4.2 les facteurs externes favorisant le développement de la maladie.	4
2.4.3 la survie.....	5
2.4.4 la dissémination	5
2.5 Les moyens de lutte	6
3. L'agent pathogène : <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> (X.c.c).....	7
3.1 Nomenclature	7
3.2 Caractères généraux	7
3.3 Techniques d'isolement et d'identification	7
4 La détection de l'agent pathogène.....	8
4.1 Objectifs	8
4.2 Les techniques de détection	8
4.2.1 test de pouvoir pathogène	8
4.2.2 techniques sérologiques	9
4.2.3 dénombrement sur milieux gélosés semisélectifs	9
4.2.4 techniques moléculaires	9
4.3 La PCR (Polymerase Chain Reaction)	9
4.3.1 généralités	9
4.3.2 mise au point de la PCR sur X.c.c.....	10
MATÉRIEL ET MÉTHODES	12
1. Les souches bactériennes	12
1.1 Description	12
1.2 Culture et numération	12
2. L'ADN plasmidique : pFL1	12

3. La N-PCR	12
3.1 Sélection des amorces	12
3.2 Les conditions de la N-PCR	13
4 Détection et analyse des produits d'amplification	13
4.1 Détection électrophorétique	13
4.2 Détection colorimétrique	13
5. Tests d'inhibition de la N-PCR	14
5.1 Effet des extraits d'agrumes	14
5.2 Effet du cuivre	14
6. N-PCR quantitative	14
7. Application de la N-PCR qualitative et quantitative à l'étude de la dissémination de <i>X.c.c</i> par la pluie.	15
7.1 Dispositif	15
7.2 Suivi de la propagation de la bactérie	15
8. Analyses statistiques	16
 RESULTATS	 17
1. N-PCR sur ADN plasmidique purifié	17
2. Sensibilité de la N-PCR	17
2.1 Sensibilité de la N-PCR sur pFL1	17
2.2 Sensibilité de la N-PCR avec la souche de <i>X.c.c</i> JA159-1	18
2.3 Analyse des résultats	18
3. Effet des extraits d'agrumes et du cuivre sur l'amplification	19
3.1 Effet des extraits d'agrumes	19
3.2 Effet du cuivre	19
4. PCR quantitative	19
4.1 N-PCR sur A31	20
4.2 Quantification de pFL1 par N-PCR	20
4.3 Quantification de la souche JA159-1	20
4.4 Analyse des résultats	21
5. Application de la N-PCR qualitative et quantitative à l'étude de la dissémination de <i>X.c.c</i> par la pluie	21
5.1 suivi de la dissémination sous l'effet d'une pluie fine	21
5.2 suivi de la dissémination sous l'effet d'une pluie de forte intensité	22
5.3 quantification de <i>X.c.c</i> sur les plants malades après traitement par la pluie	22
 DISCUSSION	 24
 CONCLUSION	 29

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30
-----------------------------------	----

INTRODUCTION

Le chancre bactérien ou chancre citrique, causé par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (X.c.c), est l'une des maladies les plus sérieuses affectant les agrumes. Originaires du Sud Est asiatique ou de l'Inde, la maladie est endémique en Orient (KOIZUMI, 1985). Elle constitue une véritable menace pour l'agrumiculture dans les pays où le chancre ne sévit pas encore ou a été éradiqué (CIVEROLO, 1981). Des procédures de quarantaine ont été mises au point pour les pays où la maladie existe afin de mieux la contrôler et d'empêcher sa propagation à travers le monde (Anonyme, 1990).

Il existe au moins trois formes bien reconnues de la maladie causées par différents variants de X.c.c : la forme asiatique ou chancre A présente dans les zones agrumicoles du monde entier à l'exception du bassin Méditerranéen, des Caraïbes, de l'Afrique et des USA. La forme B, présente dans quelques pays d'Amérique du sud (Argentine, Paraguay et Uruguay). Le chancre C ou chancre de la lime Mexicaine présent au Brésil.

Un chancre D a été décrit au Mexique au début des années 80 sur lime mexicaine. Il semble que dans ce cas, les *Xanthomonas* isolées soient des pathogènes secondaires voire des saprophytes, l'agent causal étant un champignon du genre *Alternaria*.

La forme la plus répandue, la plus sévère et possédant le spectre d'hôtes le plus large est la forme asiatique: c'est celle qui sévit à la Réunion ainsi que dans tous les pays riverains de l'Océan Indien.

Les différents variants ou pathotypes de X.c.c ont tout d'abord été distingués par leur spectre d'hôtes et leur origine géographique puis, leur existence a été rapidement confirmée par l'utilisation d'un grand nombre de techniques d'identification (tests physiologiques et biochimiques, empreintes métaboliques, sérologie, sensibilité vis à vis de bactériophages, RFLP...). Toutes confirment une grande variabilité inter et intrapathotype.

La détection fiable du pathogène est une nécessité pour tous les pays concernés par le chancre bactérien. C'est pourquoi le développement de méthodes de diagnostic performantes constitue une priorité.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'île de la Réunion est le seul territoire de la Communauté Européenne où sévit le chancre bactérien. Celui-ci représente avec la Tristeza (maladie d'origine virale) un fléau pour l'agrumiculture réunionnaise. La Réunion offre des conditions climatiques favorables au maintien et à l'extension de la maladie. Elle y a été décrite pour la première fois en 1967 (BRUN, 1971), mais ce n'est vraiment qu'après le passage de la dépression tropicale Hyacinthe en 1980 que l'on a assisté à sa recrudescence (AUBERT *et al.*, 1982).

Afin d'envisager une stratégie de lutte efficace contre le chancre bactérien, une étude épidémiologique a été engagée par le CIRAD FLHOR de la Réunion. Les études déjà réalisées ont permis de préciser le cycle biologique de *X.c.c.*, de définir les stades de sensibilité de l'hôte, de préciser l'influence des conditions climatiques sur la multiplication du pathogène ainsi que sur la vitesse d'apparition des symptômes.

L'objectif actuel est de mieux connaître les modes de dissémination du pathogène en vergers et en pépinières. Une telle étude nécessite de posséder en parallèle des techniques de détection de la bactérie spécifiques et sensibles.

Différentes techniques sont étudiées pour détecter le pathogène à l'île de la Réunion. La PCR (Polymerase Chain Reaction) récemment mise au point pour *X.c.c.* (HARTUNG *et al.*, 1993) est évaluée pour ses critères de sensibilité, de spécificité et de facilité en vue d'un usage en routine.

Le but de cette étude est d'optimiser cette technique de détection par la mise au point d'un protocole de "nested" PCR (N-PCR) et par l'utilisation d'une méthode de détection des produits d'amplification par colorimétrie (ELISA).

Les performances de cette technique seront testées sur ADN purifié, sur cultures bactériennes pures et sur matériel végétal contaminé avant et après traitement chimique par des sels de cuivre.

Le second volet de cette étude sera consacré à la mise au point d'un protocole de N-PCR quantitative que l'on comparera à une autre technique de quantification : le dénombrement sur milieu sélectif. Son application dans le cadre de l'étude de la dissémination de *X.c.c.* par la pluie permettra d'appliquer la N-PCR à des études d'écologie microbienne.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: Production fruitière mondiale en millions de tonnes (données FAO - in VERNIERE, 1992).

	1979-81	1984	1986	1990
Raisins	66,2	65,1	66,9	63,0
Pommes	34,5	39,9	40,9	42,0
Pêches et Nectarines	5,5	6,2	6,2	-
Agrumes	53,0	-	-	64,5
Bananes	37,4	40,6	41,3	42,0
Plantains	25,2	23,7	27,2	-

Tableau 2: Évaluation de la production mondiale d'agrumes en millions de tonnes (données FAO - in VERNIERE, 1992).

	1971-72 1975-76	1976-77 1980-81	1987-88	1988-89	1989-90
Oranges	30,69	36,56	42,34	43,67	46,21
Tangerines	6,71	7,43	8,47	8,18	8,37
Limes et citrons	4,09	4,72	6,24	6,29	6,25
Pomelos	3,72	4,30	4,77	4,91	4,03
Total	51,07	53,01	61,84	63,06	64,49

Tableau 3: Les importations d'agrumes à l'île de la Réunion (en tonnes) (Anonyme, 1993).

AGRUMES	1989	1990	1991	1992
Citrons et limes	430	510	457	630
Clémentines	27	34	43	31
Mandarines et hybrides	17	21	18	36
Oranges et tangors	3807	3027	2793	2749
Pomelos	104	140	114	249
TOTAL	4385	3731	3425	3695

1. L'hôte: les agrumes

1.1 Définition et répartition géographique

L'ensemble des arbres et des fruits, économiquement utiles à l'homme, appartenant aux trois genres *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus*, de la famille des Rutacées et sous famille des Aurantioïdées, est désigné par le terme agrumes.

De façon plus générale, le terme agrumes désigne le citron et les fruits voisins : orange, mandarine, clémentine, pamplemousse, combava etc.

Originaire du sud est asiatique, l'agrumiculture s'est rapidement répandue vers le bassin méditerranéen et l'Afrique pour gagner, via l'Europe, les Amériques. Actuellement, elle est répandue dans toutes les zones subtropicales, tropicales et tempérées du globe, comprises entre les latitudes 23°5 nord et sud (CASSIN, 1984).

1.2 Production mondiale

En 1989-90, l'agrumiculture est devenue la première production fruitière avec 65 millions de tonnes juste devant les raisins (Tableau 1).

Les oranges occupaient la place la plus importante en 1990 avec plus de 70% de la production totale devant les tangerines (appellation regroupant les clémentines et les mandarines), les limes et citrons et les pomelos (Tableau 2). Les États-Unis et le Brésil sont les principaux producteurs.

A la Réunion, le verger agrumicole occupe la deuxième place derrière celui du litchi. Cependant, la production réunionnaise d'agrumes ne permet pas de couvrir la consommation locale ce qui oblige la Réunion à avoir recours aux importations (Tableau 3).

2. La maladie: le chancre bactérien des agrumes

Le chancre bactérien des agrumes (CBA), ou chancre citrique appelé "Citrus Bacterial Canker Disease" par les anglo saxons, est une maladie bactérienne causée par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915), DOWSON, 1939 (DYE *et al.*, 1980).

2.1 Répartition géographique et origine

Cette maladie représente l'une des affections principales des agrumes à l'île de la Réunion mais aussi dans de nombreuses zones agrumicoles du monde. En effet, le chancre citrique est présent dans 20 états d'Asie et 6 états d'Océanie (KOIZUMI, 1985). Seul le pourtour méditerranéen, les Caraïbes, l'Afrique et les USA semblent aujourd'hui épargnés (VERNIERE *et al.*, 1992).

Il faut noter que la maladie a totalement été éradiquée de certains pays comme la Nouvelle Zélande, l'Afrique du Sud et le Mozambique (STALL *et al.*, 1981 ; VERNIERE *et al.*, 1992) ainsi que récemment en Floride (CIVEROLO, communication personnelle).

De la même façon, elle est réapparue en Australie depuis 1991 après plusieurs décennies d'absence (BROADBENT *et al.*, 1992) ; son éradication est en cours.

Le chancre bactérien continue de se répandre dans de nouveaux pays tels que l'Iran (ALIZADEH & RAHIMIAN, 1990), les Émirats Arabes Unis (EL GOORANI, 1989), la République du Yémen (BARNES, 1988), l'Irak (IBRAHIM & BAYAA, 1989) l'Archipel des Maldives (ROÏSTACHER & CIVEROLO, 1989).

La maladie, observée pour la première fois au Japon en 1889 (CIVEROLO, 1984), aurait pour origine l'Inde ou l'île de Java, pays à partir desquels elle se serait répandue vers les autres régions d'Asie et du globe.

A l'île de la Réunion, le CBA a été décrit pour la première fois en 1967 (BRUN, 1971) qui signalait la maladie sur combava, pomelo et limettier mexicain ainsi que sur oranger et citronnier. Il est cependant fort probable qu'il était préexistant depuis plusieurs années, voire plusieurs décennies.

Tableau 4 : Degrés de sensibilité des principales espèces d'agrumes et des cultivars hybrides à *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

Classes de sensibilité				
	Très sensible	Sensible	Peu sensible	Tolérant
Culture fruitière	<i>C. paradisi</i> (Pomelo)	<i>C. latifolia</i> (Lime de Tahiti et de Perse)	<i>C. medica</i>	<i>C. bergamia</i> (Bergamotier)
	<i>C. aurantifolia</i> (Lime mexicaine)	<i>C. limettitioides</i> (Lime douce)	<i>C. limon</i> (Citron)	<i>C. unshiu</i> (Mandarinier Satsuma)
	<i>C. hystrix</i> (Combava)	<i>C. reticulata</i> (Mandarinier)		<i>C. reshniyuzu</i>
			<i>C. grandis</i> (Pamplemoussier)	<i>C. calamondin</i>
		<i>C. sinensis</i> (Oranger doux)		<i>C. junos</i>
		Tangelo *		<i>C. madurensis</i>
		Tangor *		<i>Fortunella</i> spp. (Kumquat)
Porte greffe	<i>Poncirus trifoliata</i> (Oranger trifolié)	<i>C. limettitioides</i>	<i>C. macrophylla</i> (Alemow)	
	Citrance *	<i>C. limonia</i>		
	Citrumelo * vis-à-vis du pathotype E	<i>C. jambhiri</i> (Limon rugueux)		
		<i>C. aurantium</i> (Oranger acide)		
		<i>C. reshni</i> (Mandarinier Cléopatre)		

* Cultivars hybrides :

- Citrance : *C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*
- Citrumelo : *Poncirus trifoliata* x *C. paradisi* cv. 'swingle'
- Tangelo : *C. reticulata* blanco x *C. paradisi*
- Tangor : *C. sinensis* x *C. reticulata* blanco

2.2 Importance économique

La maladie, en entraînant une chute prématurée des fruits, une défoliation des arbres et le développement de lésions sur les fruits occasionne des baisses de rendement de production et rend les agrumes affectés inacceptables sur le marché. C'est l'apparence externe des fruits qui est altérée et non pas leur valeur gustative : ils restent consommables localement, surtout dans les pays où la demande est insatisfaite.

De plus, les pays atteints par le CBA sont soumis à des règles strictes de quarantaine leur interdisant toute exportation de fruits frais vers des pays où l'agrumiculture est indemne de chancre (USA et Europe par exemple).

2.3 Symptomatologie

Le diagnostic par simple observation visuelle reste délicat car les symptômes causés par *X.c.c* peuvent être confondus avec ceux d'autres affections non bactériennes (ROSSETI, 1981 ; AUBERT *et al.*, 1982). Les lésions caractéristiques du CBA se développent sur toutes les parties aériennes, essentiellement sur des organes jeunes.

Sur feuilles, les lésions apparaissent sur les faces supérieures et inférieures. Des petites taches aqueuses apparaissent d'abord (VERNIERE *et al.*, 1992). Elles brunissent ensuite pour se bomber et se transformer en lésions cratériformes. Un halo chlorotique les entoure le plus souvent (Planche 1).

Les lésions sur rameaux (Planche 2) et fruits (Planche 3) ressemblent à celles observées sur feuilles. Elles restent localisées au niveau de l'épicarpe pour les fruits.

Aucun symptôme n'a été observé sur fleurs et ils sont très rares sur racines aériennes.

2.4 Épidémiologie

2.4.1 l'infection

Les cellules de *Xanthomonas* présentes à la surface des plantes ont besoin d'envahir les tissus afin de se multiplier et d'induire la maladie. Ne possédant pas de mécanismes actifs pour traverser les barrières protectrices de la plante, les bactéries peuvent pénétrer dans les tissus par les ouvertures naturelles que sont les stomates et lenticelles. Elles peuvent aussi pénétrer par les blessures créées par le vent, les insectes ou l'homme (GOTO, 1962 ; KOIZUMI, 1983 ; GRAHAM *et al.*, 1992 ; BRUN, 1971). Les bactéries infectent principalement les jeunes tissus ; ainsi leur sensibilité est maximale quand les feuilles et tiges mesurent 50 à 80 % de leur taille adulte (KOIZUMI, 1983).

La sensibilité des feuilles varie avec l'âge des tissus : les feuilles matures deviennent résistantes à l'infection stomatale alors qu'elles restent sensibles à l'infection par blessure (OTA, 1967 ; KOIZUMI, 1972 ; CIVEROLO, 1984). Il en est de même pour les fruits qui sont sensibles pendant leur période de croissance et deviennent résistants avant leur maturité (STALL *et al.*, 1981).

Une étude récente a montré qu'il n'existe aucune différence de structure entre les stomates jeunes et âgés ou entre structure et densité de stomates de plantes sensibles et tolérantes. La résistance d'un tissu serait plutôt due à la réduction de la multiplication des bactéries dans les espaces intercellulaires chez les espèces tolérantes (GRAHAM *et al.*, 1992).

Le Tableau 4 résume les différents degrés de sensibilité au chancre bactérien au sein de la famille des Rutacées.

2.4.2 les facteurs externes favorisant le développement de la maladie

La maladie s'établit en climat chaud et humide. La présence d'eau libre (pluie, rosée, irrigation) ainsi que de températures comprises entre 14 et 38°C (avec un optimum de 26°5 à 30°C) est indispensable à l'infection (BRUN, 1971, KOIZUMI, 1976 ; KOIZUMI, 1985 ; CIVEROLO, 1984).

Les attaques du chancre sont sévères dans les régions où température et pluie augmentent en même temps durant l'année. L'île de la Réunion par exemple, offre un climat tropical humide idéal qui comporte deux saisons ayant des effets différents sur l'évolution de la maladie :

Planche 1. Lésions caractéristiques du chancre bactérien des agrumes sur feuilles



Lésions sur feuilles.



Pustules chancreuses

Planche 2. Symptômes sur rameaux du à *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

Lésions sur rameau.

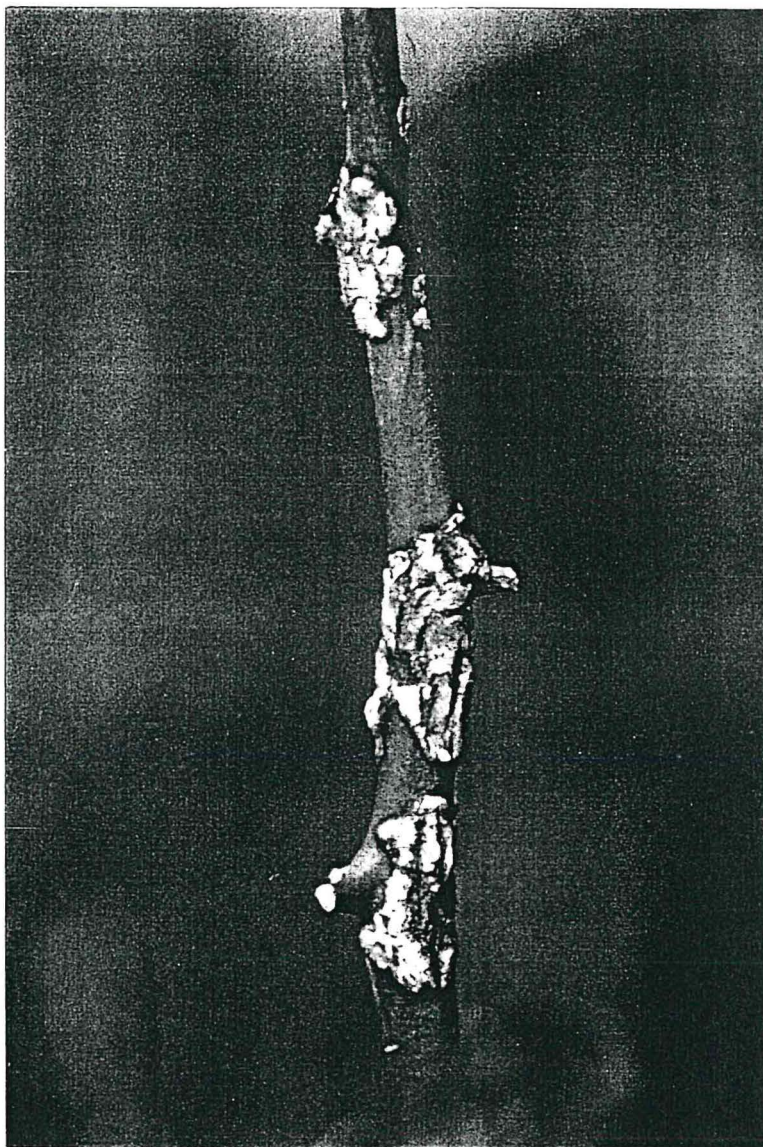
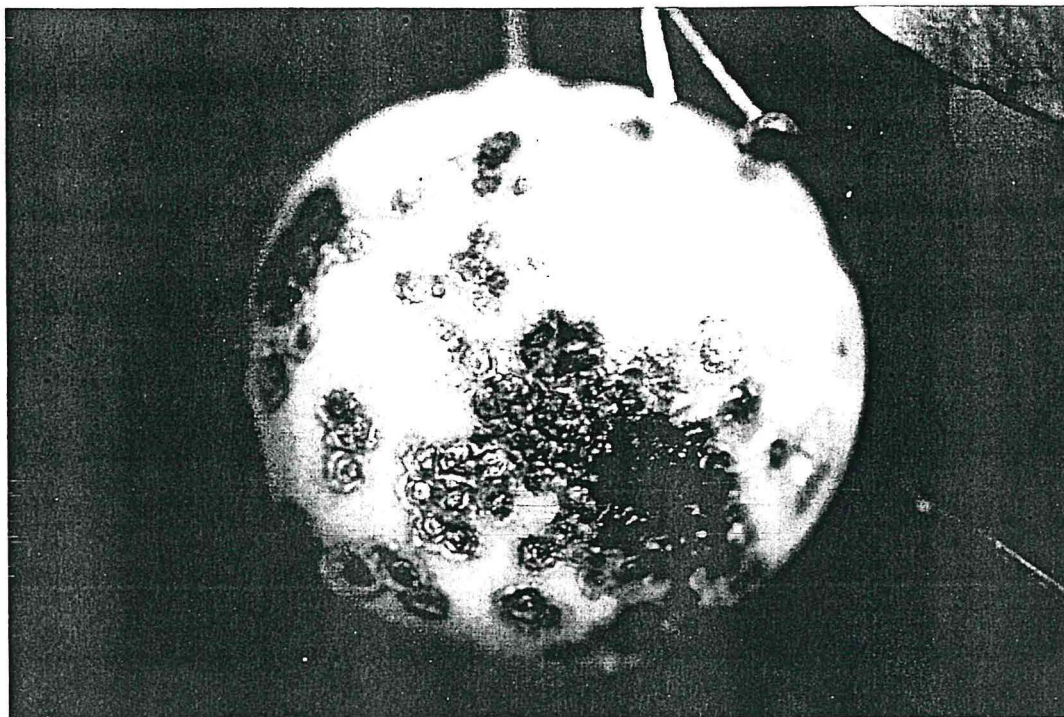
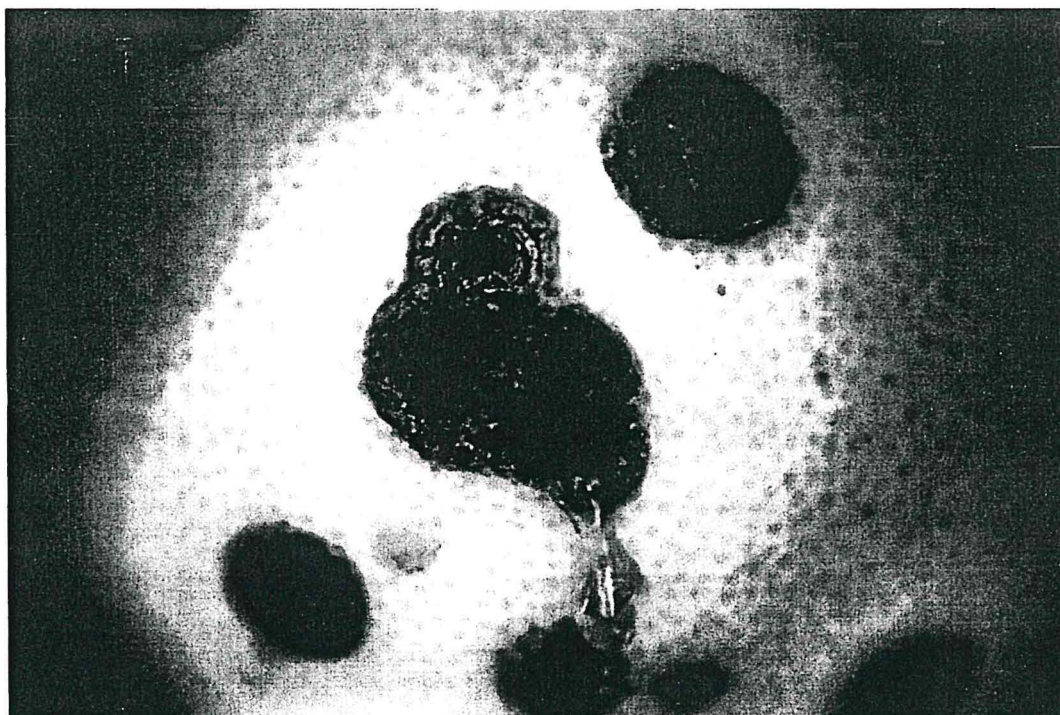


Planche 3. Lésions caractéristiques du chancre bactérien des agrumes sur fruit



Lésions sur fruit.



Pustules chancreuses sur fruit.

l'une favorable à l'extension parce que chaude et pluvieuse (températures moyennes de 25 à 26°C au niveau de la mer d'octobre à mars) ; l'autre au contraire, beaucoup plus fraîche et sèche (20 à 22°C au niveau de la mer d'avril à septembre) où *X.c.c* se trouve généralement en phase de survie.

La période de latence (entre l'infection et l'apparition des symptômes) est de 5 à 6 jours à 30°C et de plusieurs mois à 15°C (CIVEROLO & STAPLETON, 1984).

2.4.3 la survie

X.c.c peut survivre pour un certain temps sous forme parasitaire dans les tissus malades, sous forme épiphyte sur plantes hôte ou sous forme saprophyte sur plantes non hôte et dans le sol. Ces trois formes de survie sont très différentes si on considère leur potentialité vis à vis de la propagation de la maladie.

- Survie sous forme parasitaire :

Les lésions chancreuses, principales sources d'inoculum, sont connues pour être la principale source d'inoculum (GOTTWALD *et al.*, 1992). Les lésions peuvent contenir 10^6 à 10^8 bactéries et exsuder 10^5 à 10^6 bactéries/ml (STALL *et al.*, 1980).

Les bactéries peuvent observer une période de latence prolongée : c'est le cas au Japon en automne où *X.c.c* reste en phase de latence au sein de tissus infectés mais ne présentant pas de symptômes. Les lésions n'apparaissent alors qu'au printemps suivant (KOIZUMI, 1977).

- Survie sous forme épiphyte :

L'agent pathogène peut survivre en épiphyte à la surface des organes des plantes hôte sans qu'aucun symptôme ne soit observé (TIMMER, 1989 ; VERNIERE, 1992). Les bactéries épiphytes peuvent jouer un rôle important dans le cycle biologique des maladies comme source potentielle d'inoculum. Mais dans le cas de *X.c.c*, l'importance épidémiologique de cette phase est en fait très discutée (TIMMER, 1989). Des expériences d'infestations artificielles indiquent que *X.c.c* peut survivre quelques mois en épiphyte uniquement sous forte hygrométrie (VERNIERE, 1992).

- Survie sous forme saprophyte :

L'agent pathogène peut survivre en petites quantités et pendant des durées limitées sur plantes non hôte (GOTO *et al.*, 1975)

Les populations de *X.c.c* diminuent rapidement dans les lésions des organes tombés au sol. La bactérie disparaît lorsque le mésophylle est totalement dégradé (SERIZAWA, 1981).

X.c.c peut survivre dans la rhizosphère des plantes hôtes et non hôtes. Cependant, il semble que la bactérie ne se maintienne que pendant de courtes périodes allant de 2 à 8 semaines. Cette durée dépend des conditions d'humidité, de température, de la présence ou non de débris végétaux et du pH (CIVEROLO, 1984).

2.4.4 la dissémination

Les mécanismes impliqués dans la dispersion de la bactérie à courtes ou à longues distances sont nombreux :

- Le facteur humain :

La dispersion de la maladie à longue distance est principalement liée au transfert de matériel végétal infecté (CIVEROLO, 1984). A courte distance, le développement de la maladie est souvent conditionné par la présence de plantes malades dans les vergers lors de la plantation.

L'homme est le principal responsable par le transport de matériel végétal infecté d'un pays à un autre mais aussi par sa propagation à l'intérieur d'un territoire : déplacements dans les vergers, irrigation, taille... (BRUN, 1971 ; CIVEROLO & STAPLETON, 1984).

- La pluie et le vent :

Les facteurs climatiques sont plutôt à l'origine d'une dissémination de *X.c.c* sur des courtes distances : à l'échelle de la plante ou de la parcelle.

L'eau nécessaire à la pénétration des bactéries dans les tissus est un facteur important pour la propagation de la maladie. En effet, la bactérie en se développant à la périphérie des lésions se disperse dans l'eau de pluie qui tombe sur de nouvelles pousses.

Cet effet est particulièrement important dans les pépinières où la proximité des plantes rend les contacts plus faciles. Les bactéries se propagent du plant malade aux plants sains uniquement par des gouttes qui tombent sur les feuilles (STALL *et al.*, 1980 ; TIMMER *et al.*, 1991).

Il faut noter que de fortes pluies sont susceptibles de lessiver les bactéries (SERIZAWA, 1981).

Le vent permet la progression de la maladie en verger par le transport de micro gouttes d'inoculum (KUHARA, 1978) et par la création de blessures sur les feuilles augmentant ainsi le nombre de sites propices à l'infection (SERIZAWA & INOUE, 1976). Son action est importante lorsque la vitesse du vent est supérieure à 6,5 m/sec.

- Les insectes :

La mineuse des feuilles (*Phyllocnistis citrella*), en creusant des galeries dans le parenchyme foliaire, crée des blessures (GOTO, 1962).

2.5 Les moyens de lutte

X.c.c est un organisme de quarantaine dans de nombreux pays (Anonyme, 1990). Des moyens de lutte doivent à la fois éviter la dissémination vers des zones indemnes de chancre citrique mais aussi contrôler la maladie là où elle existe déjà.

La lutte par éradication n'est envisageable que si la maladie est présente sur un territoire depuis peu de temps. Dans tous les cas, elle demande de grosses disponibilités financières. Cette méthode est non envisageable à la Réunion (endémie, présence de rutacées sauvages pouvant potentiellement héberger l'agent pathogène). Elle a, cependant été réussie dans de nombreux pays tels que l'Afrique du Sud ou la Nouvelle Zélande (BRUN, 1971) ou plus récemment en Floride (CIVEROLO, communication personnelle).

Les autres moyens de lutte, applicables dans les pays où la maladie est endémique, sont les suivants :

- Lutte chimique :

L'utilisation de produits à base de cuivre (sels de cuivre) donne d'assez bons résultats sur des variétés peu sensibles. Leurs effets sont plus bactériostatiques que bactéricides (STALL *et al.*, 1980) et sont limités à la surface des organes. Ils n'ont pas d'action sur les bactéries présentes à l'intérieur des lésions.

Des antibiotiques ont aussi été testés, notamment le sulfate de streptomycine. Ils sont cependant moins efficaces que le cuivre et interdits par la législation française.

- Lutte par des méthodes culturales :

Elles consistent principalement à sélectionner dans la mesure du possible des espèces ou variétés tolérantes ou faiblement sensibles, à détruire les organes atteints, à mettre en place des haies brise-vent, à adapter l'irrigation, à travailler avec des outils désinfectés et à produire des plants de pépinière indemnes de maladie (KOIZUMI, 1985 ; CIVEROLO, 1984).

3. L'agent pathogène

3.1 Nomenclature

La bactérie responsable de la maladie appartient au genre *Xanthomonas* qui ne contient que des espèces phytopathogènes. Six espèces font partie de ce genre : *Xanthomonas campestris* en est l'espèce type (BRADBURY, 1986).

Les *X. campestris* pathogènes vis à vis de plantes botaniquement proches ont été regroupées sous le terme de **pathovar** (désigné pv.). Ainsi toutes les souches de *X. campestris* infectant des espèces de *Citrus* et causant le CBA sont désignées comme *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (*X.c.c*).

Plusieurs variants de cet agent pathogène ont été décrits. Ils induisent des formes de la maladie d'incidences économiques très variables : ces variants sont regroupés sous le terme de pathotype (DYE *et al.*, 1980). On distingue 3 principaux pathotypes :

-Le **pathotype A** : il occasionne le chancre asiatique et possède le spectre d'hôte le plus large. Il affecte tous les agrumes et en particulier les pomelos, les limettiers, les citronniers et les orangers. Il se retrouve dans la quasi totalité des pays concernés par le chancre. C'est le pathotype qui sévit à la Réunion (AUBERT *et al.*, 1982 ; LAVILLE, 1985).

-Le **pathotype B** : il provoque le chancre sud américain. Il est présent en Argentine, en Uruguay et au Paraguay. Il affecte surtout les citronniers et les limettiers.

-Le **pathotype C** : il induit le chancre de la lime Mexicaine. Sa présence est limitée au Brésil.

-Le **pathotype D** : il a été observé en 1981 sur lime Mexicaine au Mexique. Il n'induit pas de symptômes sur fruits. La maladie serait en fait due à un champignon du genre *Alternaria*, isolé constamment des symptômes. *X.c.c* ne serait dans ce cas qu'un opportuniste.

Les souches de types B, C et D moins agressives que celles du pathotype A ne constituent qu'une menace très limitée pour l'agrumiculture.

Une nouvelle maladie causée par *Xanthomonas campestris* est apparue en Floride en 1984 dans les pépinières. Nommée "Citrus Bacterial Spot Disease" par les anglo-saxons, cette maladie possède une symptomatologie atypique sur les hôtes sensibles que sont *Poncirus trifoliata* et ses hybrides. Identifié à l'origine comme un nouveau variant de *X.c.c* (nommé **pathotype E**), l'agent pathogène fut rebaptisé *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* au vu de différences marquées de sa structure génomique (GABRIEL *et al.*, 1989).

3.2 Caractères généraux

X.c.c est une bactérie Gram négatif en forme de bâtonnet (1,5 à 2 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large). Elle est mobile grâce à un unique flagelle polaire.

Les *Xanthomonas* se caractérisent par la synthèse de pigments jaunes spécifiques appartenant au groupe des xanthomonadines.

Sur milieux gélosés contenant de la peptone et une source de carbone (ex : LPGA), les colonies sont bombées, circulaires, de 3 à 4 mm de diamètre, entourées d'un mucus dû à la production de polysaccharides extracellulaires (EPS) après 3 à 4 jours d'incubation à 28-30°C.

Les bactéries se multiplient de 7 à 32°C. Leur température optimale de croissance est 28°C. Elles ont un métabolisme respiratoire aérobie strict, possèdent une catalase et n'ont pas d'oxidase.

3.3 Techniques d'isolement et d'identification

Différentes études réalisées sur les souches de *X.c.c* ont montré une grande variabilité inter et intrapathotype ; d'où la nécessité d'utiliser des techniques d'identification précises afin de mieux connaître l'agent pathogène et d'envisager une lutte efficace contre lui.

L'isolement de *X.c.c* peut se faire sur milieux gélosés sélectifs ou non. Après 3 à 4 jours d'incubation à 28 °C une première sélection peut être faite sur la couleur des colonies, leur forme bombée et leur aspect muqueux.

Les techniques d'identification les plus couramment utilisées pour caractériser les différents pathotypes sont :

-les techniques biochimiques basées principalement sur l'utilisation de différentes sources de nutriments. Ces tests ont l'avantage d'être simples et peu coûteux mais ils ont un temps de réponse important et sont lourds à mettre en oeuvre.

-les techniques sérologiques telles que l'immunodiffusion, l'agglutination, l'immunofluorescence et les techniques ELISA basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (ALVAREZ *et al.*, 1991) ou polyclonaux spécifiques (CIVEROLO & FAN, 1982). Ces techniques rapides et peu coûteuses permettent une différenciation des souches du pathotype A. Cependant l'existence de réactions croisées nécessite une validation par d'autres méthodes.

-les techniques lysotypiques basées sur la sensibilité des souches vis à vis des citriphages CP1, CP2 et CP3. Peu coûteux, ces tests permettent uniquement une différenciation spécifique des souches du pathotype B (VERNIERE *et al.*, 1992).

-les techniques basées sur les propriétés des acides nucléiques. Les techniques suivantes : empreintes génomiques (HARTUNG & CIVEROLO, 1987), RFLP (GABRIEL *et al.*, 1988 ; HARTUNG & CIVEROLO, 1989) et profils de restriction de l'ADN plasmidique (PRUVOST *et al.*, 1992) permettent une bonne identification des différents pathotypes.

4. La détection de l'agent pathogène

4.1 Objectifs

La lutte contre le CBA à la Réunion étant impossible par éradication, son contrôle réside sur la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée. Elle consiste notamment à diffuser aux agriculteurs des plants de pépinières indemnes de *X.c.c.* Il a en effet été montré que le développement de la maladie en vergers est souvent liée à la plantation de plantes malades ou porteuses saines d'inoculum. Pour cela, il est nécessaire de disposer de techniques de détection spécifiques et sensibles.

Par ailleurs, la propagation de la maladie à longue distance peut être limitée si le contrôle du matériel végétal aux frontières est efficace. Des moyens de détection sûrs sont là encore indispensables.

Enfin, le diagnostic de la maladie à partir de plants atteints sans mise en culture de l'agent pathogène repose également sur des techniques de détection performantes.

4.2 Les techniques de détection

Les techniques de détection de *X.c.c.* sont diverses. Dans tous les cas, elles doivent répondre à 5 critères :

- **la spécificité** : il faut détecter l'agent pathogène et lui seul.
- **la sensibilité** : il faut pouvoir mettre en évidence l'agent pathogène même lorsqu'il est présent en faible quantité. Dans le cas de la détection de *X.c.c.* , il faudra pouvoir détecter la bactérie avant même l'apparition des symptômes sur agrumes.
- **la rapidité** : pour une utilisation en routine, les tests ne doivent pas être trop lourds.
- **le temps de réponse** : les résultats doivent être connus le plus rapidement possible.
- **le coût** : les tests ne doivent pas être trop onéreux.

Il faut noter qu'actuellement aucune méthode parfaite alliant spécificité, rapidité et faible coût n'existe. Le choix des tests se fait principalement en fonction de l'équipement du laboratoire et du coût des réactifs nécessaires (VERNIERE *et al.*, 1992).

4.2.1 test de pouvoir pathogène :

La méthode la plus sûre pour détecter *X.c.c.* est d'inoculer des feuilles saines avec un broyat d'organes dont on veut tester l'état sanitaire, et d'observer l'apparition de symptômes caractéristiques (KOIZUMI, 1971). Un protocole d'inoculation de feuilles maintenues en survie en boîtes de Pétri a été mis au point (CIVEROLO, 1984). Cependant, cette technique est peu aisée car :

- c'est un test assez lourd à mettre en oeuvre.
- les symptômes n'apparaissent qu'après au moins 7 jours d'incubation à 28°C, parfois beaucoup plus si la quantité de *X.c.c* présente au départ est faible. Ceci nécessite d'incuber les feuilles en survie pendant environ 3 semaines, ce qui augmente fortement le risque de contaminations fongiques, surtout en zone tropicale.
- il est nécessaire d'obtenir une culture pure de *X.c.c* et de l'identifier à l'aide des techniques disponibles à l'issue du test de pouvoir pathogène.

4.2.2 techniques sérologiques

Elles sont basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques. L'immunofluorescence indirecte ainsi que la technique ELISA (CIVEROLO *et al.*, 1982) sont les techniques utilisées pour détecter *X.c.c*.

Ces techniques sont rapides à réaliser (48 heures maximum) et permettent une différenciation rapide des souches du pathotype A. Cependant, elles sont peu sensibles (10^3 à 10^4 cellules/ml pour l'immunofluorescence et 10^5 à 10^6 cellules/ml pour ELISA) et pèchent par manque de spécificité malgré l'utilisation d'anticorps monoclonaux. En effet, l'anticorps monoclonal A1 spécifique des souches du pathotype A ne réagit pas avec les souches rencontrées au Moyen Orient (VERNIERE *et al.*, 1993). L'immunofluorescence, plus sensible que l'ELISA, est trop fastidieuse pour être utilisable en routine.

4.2.3 dénombrements sur milieux gélosés semisélectifs

Un milieu semisélectif (KCB) a été mis au point et utilisé dans le cadre de travaux d'écologie microbienne aux USA et en Argentine (GRAHAM *et al.*, 1989). Dans les conditions de la Réunion, sa sélectivité s'est avérée insuffisante (PRUVOST, communication personnelle). Un autre milieu plus sélectif (SPATKCA), exploitant la multirésistance aux β -lactamines des souches de *X.c.c*. dans l'archipel des Mascareignes (PRUVOST *et al.*, 1994), a été mis au point (MONIER, 1992). L'isolement sur milieu semisélectif est une technique lourde à mettre en oeuvre, mais très sensible (10^1 bactéries/ml). L'identification à posteriori des colonies obtenues par au moins une des techniques disponibles est nécessaire.

4.2.4 techniques moléculaires

Il a été montré que les souches du pathotype A partagent toutes un fragment d'ADN plasmidique de 4,2 kb après digestion par l'enzyme de restriction *Bam* HI. Ce fragment est absent des autres pathotypes de *X.c.c* et du pv. *citrumelo*.

Deux sondes nucléiques : pFL62.42 et pFL1 (sous clone de pFL62.42) ont été mises au point à partir de ce fragment. La technique d'hybridation ADN/ADN par Dot Blot permet de détecter rapidement sa présence dans une souche donnée. Cette technique manque cependant de sensibilité (limite de détection : 2 ng d'ADN génomique soit environ 10^6 copies) et de spécificité vis à vis du pathotype A présent à la Réunion (signal obtenu avec certaines souches des pathotypes B et C et des pvs. *vignicola* et *bilvae* mais pas avec les souches du pv. *citrumelo*).

4.3 LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

4.3.1 généralités

Cette technique a été mise au point par SAIKI *et al.* en 1985. Elle permet d'amplifier de façon exponentielle des séquences d'ADN spécifiques par synthèse *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase résistante à la chaleur (*Taq* ADN polymérase).

Les 3 étapes principales d'un cycle de réaction sont:

- dénaturation par la chaleur de l'ADN double brin possédant la séquence à amplifier.
- hybridation de 2 amorces aux séquences spécifiques présentes sur chaque brin dénaturé.

- synthèse des brins complémentaires par extension à partir des amorces grâce à la *Taq* ADN polymérase.

Les nouveaux brins d'ADN synthétisés sont soumis à leur tour aux 3 étapes décrites ci-dessus et ce pendant de nombreux cycles. Ils constituent donc de nouvelles cibles pour les amplifications ultérieures.

La spécificité de la PCR repose sur le choix des amorces dont la séquence est complémentaire d'une séquence présente sur les brins à amplifier.

Ses performances ont tout d'abord été prouvées en microbiologie alimentaire et médicale pour la détection d'agents pathogènes bactériens ou viraux.

La détection des bactéries phytopathogènes par PCR a été décrite pour la première fois par RASMUSSEN & WULFF en 1990 qui développèrent un protocole de détection de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* dans des graines.

La sensibilité et la spécificité de la PCR peuvent être augmentées en utilisant des sondes nucléiques hybridant avec les produits d'amplification (HENSON & FRENCH, 1993). C'est ainsi qu'une sensibilité de 10^2 copies d'ADN/ml a été obtenue pour la détection de *Pseudomonas syringae* par hybridation ADN/ADN avec une sonde marquée à la digoxygénine. Ces sondes permettent d'une part de détecter les produits d'amplification présents en faible quantité et donc non visualisables après migration électrophorétique et d'autre part de s'affranchir des risques d'amplification non spécifique.

Cependant, ces techniques d'hybridation restent laborieuses et longues rendant la détection par PCR inutilisable en routine. C'est pourquoi a été mis au point un protocole de "nested PCR" (N-PCR) qui permet d'éliminer l'étape d'hybridation tout en gardant une grande spécificité.

Cette nouvelle technique basée sur l'application de 2 séries de PCR avec 2 paires d'amorces différentes (les amorces de la deuxième PCR sont spécifiques de séquences internes aux fragments amplifiés lors de la première PCR) permet une augmentation de sensibilité par rapport à une seule série d'amplification. La détection de *Mycobacterium tuberculosis* par N-PCR a permis d'augmenter la sensibilité d'un facteur 1000 par rapport à une simple PCR (MIYAZAKI *et al.*, 1993). La sensibilité obtenue après N-PCR est comparable à celle obtenue par une seule PCR suivie d'un Southern-Blot (KAPPERUD *et al.*, 1993).

La détection des produits d'amplification se fait généralement par électrophorèse en gel d'agarose. La migration permet de séparer les fragments amplifiés par leur taille. Cette technique assez longue n'est pas automatisable et rend difficile l'utilisation de la PCR en routine.

Plusieurs méthodes ne nécessitant pas la séparation par électrophorèse ont récemment été décrites pour la détection des produits d'amplification. Elles s'avèrent aussi sensibles que l'électrophorèse (LANDGRAF *et al.*, 1991). Ce sont des techniques colorimétriques basées sur l'utilisation pour la PCR d'amorces modifiées par fixation de molécules ou de nucléotides qui permettent d'une part la capture des fragments amplifiés et d'autre part la détection (STEFFEN & ATLAS, 1991). La biotine, les composés fluorescents, la peroxidase ainsi que des séquences reconnues par des protéines sont les outils les plus utilisés.

Ces techniques apparentées aux techniques immunologiques peuvent être facilement automatisables.

La PCR, longtemps considérée comme une technique qualitative, peut être utilisée dans le but de quantifier le nombre initial de molécules cibles dans un échantillon. Les techniques colorimétriques précédemment décrites peuvent servir à mesurer la quantité de produits amplifiés (LANDGRAF *et al.*, 1991). Cependant, elles exigent de se placer durant la phase exponentielle de l'amplification où il y a proportionnalité entre la quantité de produits formés et celle de l'ADN cible. La difficulté à estimer cette phase rend ces techniques inutilisables car non standardisables (SIEBERT & LARRICK, 1993).

Il semble que les meilleurs résultats de PCR quantitative obtenus sont ceux basés sur la co-amplification dans le même tube et avec les mêmes amorces de l'ADN cible et d'un ADN compétiteur servant de standard de concentration que l'on peut différencier du premier par la taille du fragment amplifié. Dans ce cas, les mesures peuvent être faites quelque soit le stade de l'amplification (PANNETIER *et al.*, 1992).

Les résultats sont visualisés soit par électrophorèse soit par colorimétrie.

4.3.2 mise au point de la PCR sur *X.c.c*

La séquence de l'insert de pFL1 a été déterminée et a permis la synthèse d' amorces spécifiques du pathotype A de *X.c.c* (HARTUNG *et al.*,1993). Seules les souches du pv.*vignicola* et une souche du pv. *bilvae* donnent une réponse positive avec ces amorces.

La sensibilité a pu être augmentée à 25 pg soit environ 10^2 copies et à 10^1 copies après hybridation des produits d'amplification avec la sonde pFL1.

L'intérêt de cette technique très sensible est qu'elle permet de détecter des bactéries présentes sur de vieilles lésions alors qu'elles sont non détectables sur milieux gélosés (HARTUNG *et al.*, 1993).

La technique PCR constitue donc un outil de détection performant. Son optimisation en vue de la rendre utilisable en routine ainsi que la mise au point d'un protocole de PCR quantitative sont les objectifs que nous nous proposons d'atteindre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 5 : Amorces de la N-PCR.

Designation	Sequence (5'.3')	Commentaire
4 7	TGT CGT CGC TTG TAT GGC GGG TGC GAC CGT TCA GGA	Produit d'amplification : 469 pb
494-3 494-4	CTC GAT CAC GAT GTC CTT CTC C GTG GAT GGC ATG AGC ATG AAG	Produit d'amplification : 295 pb
494-3 Bio	Biotine-CTC GAT CAC GAT GTC CTT CTC C	Amorce permettant la capture
494-4 <i>lac</i>	<u>AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT</u> GTG GAT GGC ATG AGC ATG AAG	Amorce permettant la détection

La séquence de l'opérateur *lac* d'*E.coli* est soulignée.

Tableau 6 : Programmes des 2 séries d'amplification de la N-PCR.

Première série : CITRI 1

1 cycle	3 min	Dénaturation	1 min	95 °C
		Association	1 min	55 °C
		Elongation	1 min	70 °C
34 cycles	2 min 40	Dénaturation	30 s	96 °C
		Association	1 min	58 °C
		Elongation	1 min 10	72 °C

Deuxième série : CITRI 2

20 cycles	Dénaturation	30 s	96 °C
	Association	30 s	58 °C
	Elongation	30 s	72 °C

1. Les souches bactériennes

1.1 Description

La souche JA159.1 isolée à la Réunion en 1981 sur clémentinier (*Citrus reticulata* cv. Clémentine) est utilisée pour la N-PCR.

La souche C40S est un mutant spontané de la souche C40 isolée de lésions foliaires sur un oranger de la variété "Washington navel" à la Réunion en 1988. Résistant à la streptomycine, il est utilisé pour l'étude de la dissémination du chancre bactérien par la pluie. Ces deux souches appartiennent au pathotype A et sont pathogènes sur agrumes.

Elles sont conservées à -80°C sous forme de microbanques (Pro Lab Diagnostic).

1.2. Culture et numération

Les bactéries sont cultivées à 28°C sur milieu LPGAT ou sur milieu SPAT en présence de 50 mg/ml de streptomycine pour la souche C40S.

Les suspensions bactériennes sont réalisées dans des tubes de tampon HCl stérile. La densité optique (DO) est mesurée à 600 nm pour évaluer la concentration des bactéries dans les tubes. Des dilutions au dixième sont effectuées dans le même tampon de sorte à obtenir des suspensions de titre inférieur. Elles seront soumises à la N-PCR.

Le nombre de bactéries est estimé parallèlement sur milieu SPAT après dépôt de 49 µl de suspension bactérienne à l'aide de l'ensemencement spiral (Interscience, FRANCE). Après incubation pendant 2 jours à 28°C, les colonies sont comptées.

La composition des milieux et tampons utilisés est donnée en Annexe 1

2. l'ADN plasmidique : pFL1

Le plasmide pFL62.42 a été construit en clonant un fragment *Bam* H1 de 4,2 kb de l'ADN plasmidique de la souche XC62 de *X.c.c* dans le vecteur pUC9 (PRUVOST *et al.*, 1992). Le plasmide pFL1 contient un fragment *Eco* R1 de 572 pb (cloné dans pUC9) provenant de l'insert de pFL62.42 (HARTUNG, 1993).

Ce plasmide, conservé dans la souche JM 107 d'*E.coli*, est extrait par la méthode alcaline décrite par BIRNBOIM & DOLY (1979) et purifié à l'aide du kit "Prep-A-Gene DNA Miniprep" (Biorad, France).

La concentration en ADN est estimée par fluorimétrie (fluorimètre TKO 100, Hoefer Scientific). Le principe de cette technique figure en Annexe 2.

Des dilutions au dixième sont réalisées dans du TE à partir de la solution mère de sorte à obtenir une gamme de concentrations s'échelonnant de 10^7 à 1 copie de pFL1/µl qui sera soumise à la N-PCR.

3. La N-PCR

3.1 Sélection des amorces

La séquence des amorces a été déterminée à partir de l'analyse de la séquence de l'insert *Eco* RI de 700 pb de pFL1. Le choix des amorces a été fait après étude de la séquence par le logiciel Mac Vector (IBI Kodak, Newhaven, CT USA) (HARTUNG, communication personnelle). Leur localisation et description sont données dans le Tableau 5 et la Figure 1.

Les amorces 4 et 7 sont utilisées pour la première série d'amplification de la N-PCR. Les amorces internes 494-3 et 494-4 sont utilisées pour la seconde série.

Pour la détection colorimétrique des produits d'amplification, on utilise les amorces marquées. L'amorce 494-3 bio possède à son extrémité 5' un résidu biotine qui permet l'immobilisation des produits d'amplification. L'amorce 494-4 *lac* possède à son extrémité 5' la séquence de 21 pb de l'opérateur *lac* d'*E.coli*, qui permet de détecter les fragments biotinylés.

10 20 30 40 50
 CGTTGCACCT CCCGCTGCAT GCGGTTGGTG TCGTCGCTTG TATGGCCTAT
 60 70 80 90 100
 AGTCGATACT GGAAATCATT ATATATATAC ATAGATAAGT ATATATATAC
 110 120 130 140 150
 CTATCAACCC TTGAGGAAGG GCTTCCAGTG CCTCGATCAC GATGTCCTTC
 160 170 180 190 200
 TCCGTGACCC TGCCGCCTTC TCTTCCGAGG CCTGAGGCCT GCGCGCGCAG
 210 220 230 240 250
 GTGATCAGCC AGTTCCTCGG GGAAGTTGAA GATTTTTTGC ACCCGTGCGC
 260 270 280 290 300
 GGCCGTAGCG CTGCGTTTCC TCAGCAGCGG GCGGCGTGCC TGCCGGTGTC
 310 320 330 340 350
 GTGGTCACGG CAGCAGGTGC CACCAGCGGC TTCTCGGCCT TGTCCGCCTC
 360 370 380 390 400
 CGCCTTCGAG GAAGCGTCGG TCTTGGCGGC TTGAAGTGGC CCGTGTTGGG
 410 420 430 440 450
 CTTGCCTTCA TGCTCATGCC ATCCACCTCC TTGAAGAAGG CTTCCATCTC
 460 470 480 490 500
 GGCGATGGCG GCTTGATCGC GGCCCAACTC CTGAACGGTC GCACCCTCGC
 510 520 530 540 550
 CAATGGCGCG GCGGAAGGCC ACGCGCTCGC AGACCTTGGT GGGCAGCACG
 560 570
 GTCAGCTTCT GCCTCGGCCA AG

4
 494-3 Bio
 494-4 Lac
 7

Figure 1 : Séquence de l'insert de pFL1 et localisation des amorces de la N-PCR

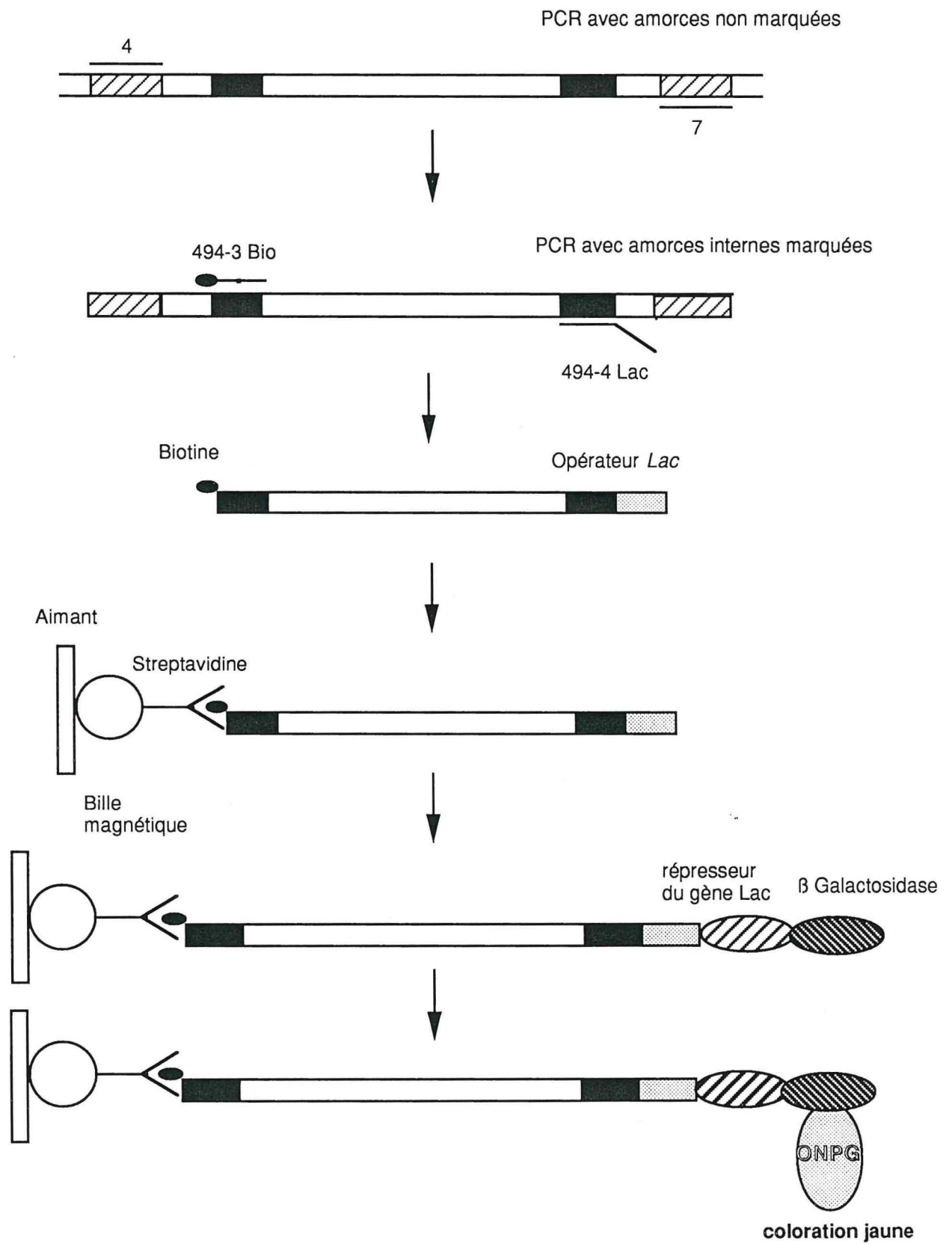


Figure 2 : DETECTION COLORIMETRIQUE des produits d'amplification

3.2 Les conditions de la N-PCR

Les réactions sont effectuées à l'aide de l'amplificateur PCR PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA).

25 µl de mélange réactionnel contenant 2,5 µl de tampon de Barry 10 x (50 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 10 % de triton X100, 1 % de gélatine, 30 mM de MgCl₂) (BARRY *et al.*, 1991), 0,5 µM de chaque amorce, 125 µM de chaque nucléotide et 0,5 U de *Taq* ADN polymérase (Boehringer Mannheim ou Gibco BRL) sont soumis après addition de l'ADN cible à l'amplification. Deux gouttes d'huile minérale stérile sont ajoutées pour éviter l'évaporation du mélange.

Le même mélange réactionnel est utilisé pour les deux séries de PCR, seules les amorces changent (Tableau 5). Un µl de la première série d'amplification sert de cible pour la seconde.

Les programmes d'amplification de la première (CITRI 1) et de la deuxième PCR (CITRI 2) sont présentés dans le Tableau 6.

Les différentes étapes précédant l'amplification sont différentes selon que l'on soit en présence d'ADN purifié ou de cellules vivantes : elles sont présentées en Annexe 3.

Afin d'éviter au maximum d'éventuelles contaminations liées à la présence d'aérosols, toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. Des embouts à filtre sont utilisés pour les micropipettes. Toutes les solutions (eau, huile, tampon) sont aliquotées en petit volume et autoclavées. Le port de gants est indispensable. Les manipulations sont réalisées dans des pièces différentes et avec des micropipettes différentes avant et après l'amplification (KWOK, 1990).

4. Détection et analyse des produits d'amplification

4.1 Détection électrophorétique

2 à 3 µl de produits d'amplification obtenus après la deuxième PCR sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 2 ou 3 % (Nusieve 3:1, FMC Bioproducts, Rockland USA) et soumis à une électrophorèse d'1 h 15 à 1 h 30 à 3,3 volts/cm dans du TAE (Annexe 1).

Les bandes d'ADN sont visualisées grâce au transilluminateur UV après coloration dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml.

Le marqueur VI (pBR328 digéré par *Bgl* I et *Hinf* I, Boehringer Mannheim.; Annexe 4) est utilisé comme marqueur de taille.

Les photographies et l'analyse des bandes est effectuée à l'aide de l'analyseur de gel GDS 5000 UVP.

4.2 Détection colorimétrique (Figure 2)

Le kit DIANA (Detection of Immobilized Amplified Nucleic Acids, Dynal, Norvège) est un système qui permet la détection colorimétrique des séquences d'ADN amplifiées. Les réactifs fournis sont utilisables pour des protocoles qualitatifs et quantitatifs.

40 µl de produits d'amplification sont mélangés à 40 µl (100 µg) de billes magnétiques lavées sur lesquelles sont fixées des molécules de streptavidine (Dynabeads M280 Streptavidine ; Dynal, Norvège).

Durant l'incubation de 15 minutes à température ambiante, les fragments biotinylés grâce à l'amorce 494-3 Bio (Tableau 5) sont capturés et immobilisés sur les particules magnétiques elles même attirées par un support -aimant.

Les billes porteuses de l'ADN immobilisé sont ensuite lavées avec 100 µl d'une solution contenant 25 mM de Tris HCl (pH 8), 0,2 M de NaCl, 1 mM d'EDTA, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de dithiothréitol et 0,05 % de Tween 20 (Tampon DIANA).

Les billes sont resuspendues dans 50 µl du même tampon et 50 µl d'une solution à 0,5 mg/ml de protéines de fusion constituées par le répresseur du gène *lac* et la β galactosidase.

L'incubation pendant 20 minutes à température ambiante permet la fixation du répresseur à la séquence de l'opérateur *lac* fixée sur l'amorce 494-4 *lac*.

Les billes séparées magnétiquement sont ensuite lavées 4 fois avec 150 µl de tampon DIANA et resuspendues dans 50 µl du même tampon.

50 µl d'une solution à 1,25 mg/ml du substrat chromogénique de l'enzyme, l'ortho nitrophényl β -D- galactoside (ONPG) sont ajoutés. Après incubation de 20 minutes, le transfert de

75 µl du mélange est réalisé dans des plaques de titration et la réaction est stoppée avec 75 µl d'une solution de Na₂CO₃ 1M.

Les échantillons positifs présentent une coloration jaune dont l'absorbance est mesurée à 405 nm par un lecteur ELISA (Bio Tek Instrument).

5. Tests d'inhibition de la N-PCR

5.1 Effet des extraits d'agrumes

7 clones de Citrus cultivés sous serre ont été utilisés pour cette expérience : le limettier Mexicain (*Citrus aurantifolia*) SRA 619, le limettier de Tahiti (*Citrus latifolia*) SRA 58, le combava (*Citrus hystrix*), le clémentinier (*Citrus reticulata* cv. Clémentine) SRA 63, Tangelo orlando (*C. reticulata* cv. Dancy x *C. paradisi* cv. Duncan), l'oranger cv. Valencia (*Citrus sinensis*) SRA 360 et le pomelo cv. Henderson (*Citrus paradisi*) SRA 336.

5 g de feuilles de chaque espèce sont prélevés et broyés dans du tampon Tris-HCl (pH 7-7,2) à l'aide du broyeur stomacher 400 (Seward Médical UK).

Les effets de 1 µl ainsi que 10 µl d'extraits d'agrumes sur la N-PCR sont testés pour les concentrations de 10¹ et 10³ bactéries (JA159.1)/réaction.

Les échantillons sans broyats d'agrumes constituent les témoins positifs. Des témoins négatifs sans bactéries sont réalisés afin de s'assurer de l'absence naturelle de *X.c.c* sur les feuilles. Les témoins sans bactérie et sans extrait d'agrumes permettent de montrer l'absence de contaminations.

Les programmes d'amplification CITRI 1 et CITRI 2. sont appliqués. 1 µl de la première série d'amplification sert d'ADN cible pour la deuxième série.

5.2 Effet du cuivre

Cette expérience est réalisée en présence de différentes concentrations d'une solution d'hydroxyde de cuivre (Champion Flo., Calliope France). La solution mère à 34 mg/100 ml est diluée dans du tampon Tris-HCl de sorte à obtenir les quantités suivantes : 340 µg, 34 µg, 340 ng, 34 ng, 3,4 ng.

L'effet de 1 µl des différentes quantités de cuivre sur la N-PCR est étudié pour des concentrations en JA159.1 (source d'ADN cible) de 10¹ et 10³ cellules/réaction.

Le cuivre est introduit uniquement dans le mélange réactionnel de la première série d'amplification et soumis au programme CITRI 1. 1 µl des produits d'amplification obtenus sert d'ADN cible pour la seconde série.

6. N-PCR quantitative (Figure 3)

La PCR quantitative est basée sur le principe de coamplification de l'ADN cible avec un ADN compétiteur de concentration connue en présence des mêmes amorces et des mêmes conditions opératoires.

L'ADN compétiteur diffère de l'ADN cible uniquement par sa taille puisqu'il possède en plus 4 copies de la séquence de l'opérateur *lac*. Cette différence de taille permet de différencier les amplifiats de l'ADN cible et de l'ADN compétiteur par électrophorèse.

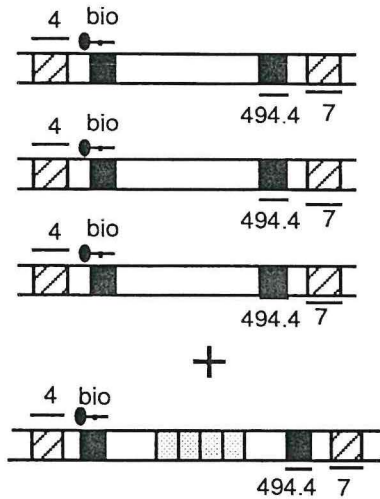
Dans notre expérience, A31 constitue l'ADN compétiteur. Sa séquence, hormis le fragment *lac*, est identique à celle de pFL1. Sa concentration est déterminée par fluorimétrie et des solutions de concentrations allant de 1 à 10⁷ copies/µl de TE sont préparées.

Chaque suspension d'ADN compétiteur est soumise à la N-PCR en présence d'une quantité fixe d'ADN cible. Ainsi, 1 µl de chaque tube de la gamme d'A31 est ajouté à 1 µl de pFL1 ou de JA159.1 dans le mélange réactionnel. Quatre concentrations de pFL1 et de JA159.1 ont été testées : 10¹, 10³, 10⁵ et 10⁷ copies de séquence cible/µl.

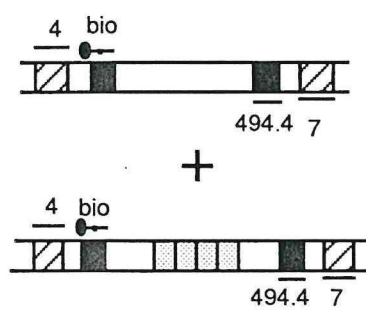
Les amorces 4 et 7 sont utilisées pour la première série d'amplification. Pour la seconde série, on utilise l'amorce 494-3 biotinylée et l'amorce 494-4 qui ne possède pas la séquence de l'opérateur *lac*.

Première étape: N-PCR

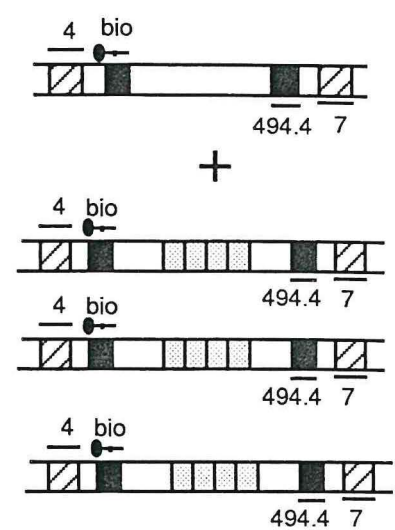
ADN cible > ADN compétiteur



ADN cible = ADN compétiteur



ADN cible < ADN compétiteur



Deuxième étape : Détection colorimétrique des produits d'amplification

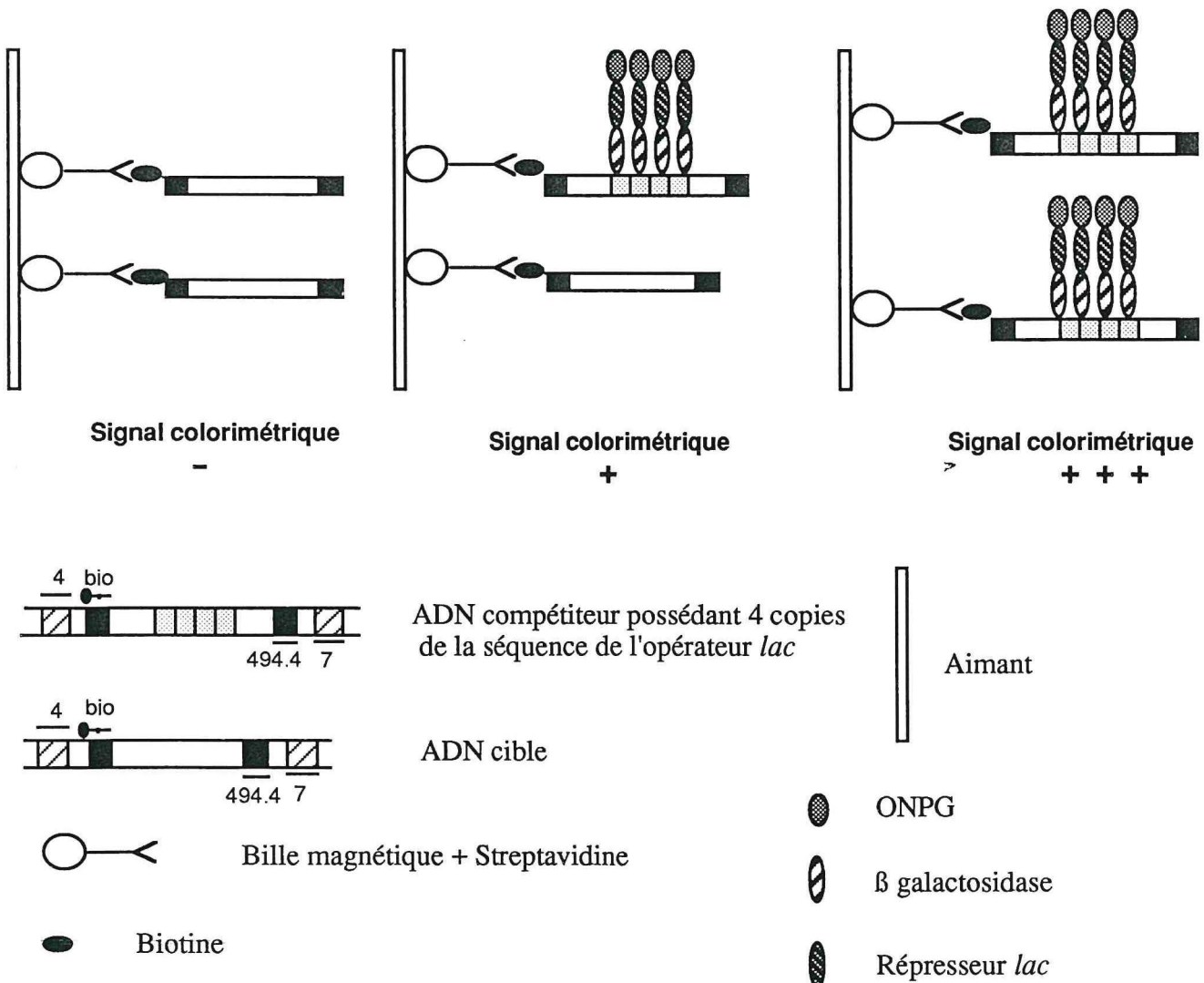


Figure 3 : Principe de la N-PCR quantitative

La seconde série d'amplification se réalise dans un volume total de 50 µl (ajout de 2 µl de produit de la première série de PCR).

La détection des produits d'amplification peut se faire par électrophorèse : on peut alors analyser les bandes (taille, intensité..) grâce à l'analyseur de gels.

Elle peut aussi se faire à l'aide du kit DIANA dont le protocole a été décrit précédemment. Dans ce cas, la protéine de fusion se lie aux séquences *lac* présentes au milieu de la séquence d'A31.

Une courbe est tracée reliant les densités optiques obtenues et les concentrations connues d'A31. Ainsi, plus la quantité d'ADN cible est importante moins l'ADN compétiteur sera amplifié d'où une diminution de l'absorbance traduisant la diminution des fragments d'amplification possédant l'opérateur *lac*. L'intensité du signal colorimétrique obtenu est donc inversement proportionnelle à la quantité d'ADN cible.

La concentration précise de l'ADN cible peut être déterminée directement à partir des courbes tracées. En effet, la valeur de DO correspondant à la moitié de l'intensité maximale traduit l'équivalence des quantités d'ADN compétiteur et d'ADN cible. Connaissant la quantité d'ADN compétiteur on en déduit la quantité précise d'ADN cible.

7. Application de la N-PCR qualitative et quantitative à l'étude de la dissémination de *X.c.c* par la pluie.

7.1 Dispositif

L'étude de la dissémination de *X.c.c* par la pluie est réalisée à l'aide d'un simulateur de pluie (ORSTOM Deltalab EID330). Celui ci se compose d'un bâti démontable et d'une buse positionnée à une hauteur de 4 mètres par laquelle l'eau sort. Un boîtier électronique gère les séquences d'arrosage et l'angle de l'oscillation de la buse. Le volume d'eau tombant ainsi sur une surface de 1 m² peut être déterminé pour des durées d'arrosage définies. La pression de l'arrivée d'eau peut aussi être réglée.

Les essais sont réalisés sur 25 jeunes limettiers Mexicains en croissance. Ils sont déposés sur le carré de 1 mètre de côté prévu à cet effet. La plante centrale inoculée par *X.c.c* présente des symptômes âgés d'environ 2 mois. Des pluies peu et très favorables à la dissémination de *X.c.c* sont appliquées sur ces plantes. La durée de précipitation est dans les deux cas de 30 minutes.

7.2 Suivi de la propagation de la bactérie

Après le traitement par la pluie, l'eau présente sur les feuilles des 25 limettiers est récoltée à l'aide de pipettes stériles et aliquotée en microtubes. Les feuilles du plant central présentant des symptômes sont prélevées et chaque symptôme est broyé à l'aide d'un ultraturax (Janke & Kunkel, Allemagne) dans du tampon Tris HCl stérile (pH 7-7,2). Les broyats sont aliquotés en microtubes.

La détection de *X.c.c* dans l'eau de pluie présente sur les feuilles des 24 limettiers sains après traitement est réalisée par N-PCR et par culture sur le milieu sélectif LPGATS (Annexe 1). L'eau prélevée sur le plant malade sert de témoin positif pour la N-PCR.

La quantification des bactéries présentes sur le plant malade avant et après traitement par la pluie, ainsi que dans l'eau de pluie collectée sur toutes les plantes est réalisée par étalement sur LPGATS de gouttes de 50 µl de dilutions au 1/10 des échantillons (2 répétitions). Les boîtes sont mises à incuber pendant 3 jours à 28°C. L'estimation des populations de *X.c.c* est réalisée par comptage des colonies caractéristiques sur milieu LPGATS. En cas de doute sur l'identité des colonies, différents tests physiologiques et biochimiques caractérisant *X.c.c* (VERNIERE *et al.*, 1991) sont effectués. Certains individus sont également étudiés par N-PCR qualitative et quantitative.

Pour la N-PCR qualitative et quantitative, les conditions opératoires décrites précédemment sont appliquées.

Afin d'augmenter la sensibilité de la PCR qualitative, un protocole d'enrichissement des suspensions en *X.c.c* est évalué. Pour ce faire, 10 µl d'échantillons d'eau de pluie sont ajoutés à 2 ml de bouillon sélectif (SPKCA - Annexe 1). Les tubes sont incubés en agitation permanente (200 rpm) à 28°C pendant des durées croissantes allant de 24 à 72 heures. Les échantillons enrichis sont ensuite analysés par N-PCR qualitative.

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Super Anova (Abacus Concepts, Berkeley, CA USA). Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les données (densités optiques) générées après détection colorimétrique des produits d'amplification ont été étudiées par analyse de variance. Les moyennes ont été comparées par le test de Student-Newman-Keuls (test de comparaisons multiples par paliers).

RÉSULTATS

numéro	échantillon
1	pFL1 1,2 10 ⁴ copies- Citri 2
2	pFL1 1,2 10 ⁴ copies - Citri 2
4	Marqueur VI
6	pFL1 1,2 10 ⁴ copies - Citri 1
7	pFL1 1,2 10 ⁴ copies - Citri 1
8	pFL1 1,2 10 ⁴ copies- Citri 1

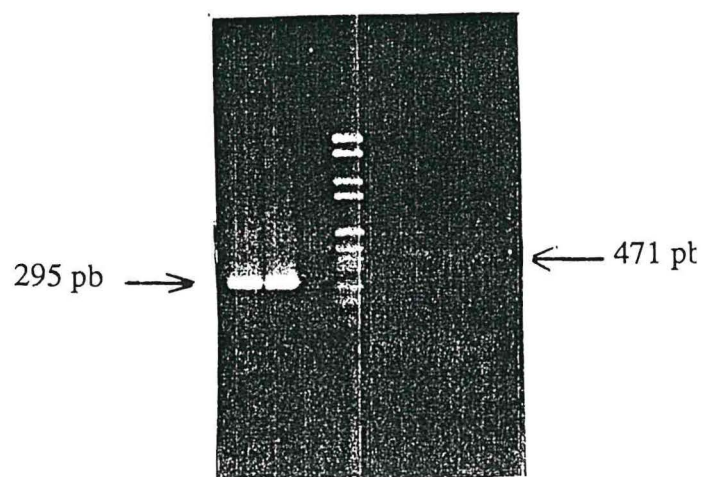


Photo 1 : Taille des produits d'amplification des 2 séries de N-PCR.

numéro	échantillon
1 à 14	pFL1 1,2 10 ⁴ - dépôt : 2 µl
15	Marqueur VI
16 à 29	pFL1 1,2 10 ⁴ - dépôt : 6 µl
30	Marqueur VI

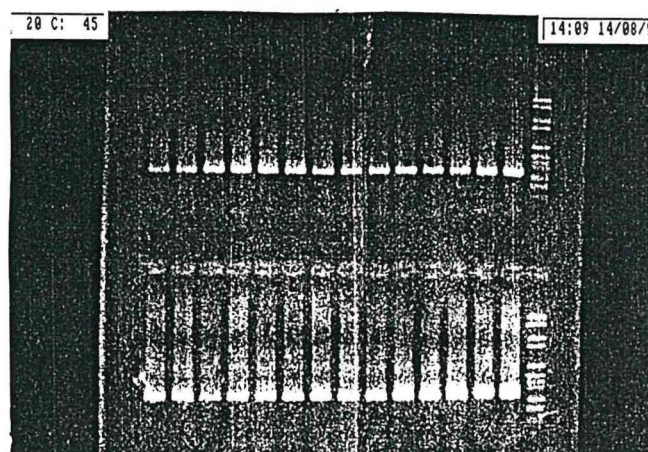


Photo 2 : N-PCR sur pFL1

1. N-PCR sur ADN plasmidique purifié

Les premiers essais de N-PCR ont été réalisés à partir de solutions d'ADN plasmidique purifié (pFL1) de différentes concentrations.

Après extraction et purification, la concentration de pFL1 est estimée par fluorimétrie à 43 ng/μl soit $1,2 \cdot 10^{10}$ copies/μl.

1.1 Examen des produits d'amplification

La première série d'amplification réalisée avec les amorces 4 et 7 (Figure 1) génère la bande attendue de 471 pb (Photo 1). La visualisation de cette bande a été obtenue dans le cas présent pour une concentration en pFL1 avant amplification de $1,2 \cdot 10^4$ copies/μl.

La deuxième série d'amplification utilise les amorces 494-3 et 494-4 (Figure 1). La taille attendue des produits d'amplification est de 295 pb. Des valeurs de 294 à 302 pb sont déterminées par analyse du gel (Photos 1 et 2).

Une amplification optimale a été obtenue dans les conditions opératoires choisies pour notre étude (Photo 2). Le nombre, la durée et la température des cycles des 2 séries d'amplification de la N-PCR sont présentés dans le Tableau 6. Une augmentation du nombre de cycles induit l'apparition de réactions positives parmi les témoins négatifs, alors qu'une diminution affecte la sensibilité du test.

Les étapes décrites ci-dessous sont primordiales pour une bonne sensibilité, spécificité et reproductibilité de la N-PCR :

- l'ajout de 2 gouttes d'huile dans les cupules de l'amplificateur PCR afin de faciliter le contact thermique entre les tubes et le bloc chauffant. La Photo 3 met en évidence l'importance de cette étape.

- la réalisation d'un démarrage à chaud ("hot start") qui consiste à exclure du mélange réactionnel un composé essentiel à l'amplification (*Taq* ADN polymérase ou ADN cible) et à l'introduire après chauffage du mélange réactionnel à une température qui minimise les mésappariements (72°C). La Photo 4 montre le résultat obtenu si cette condition n'est pas respectée.

- la réalisation du mélange réactionnel dans des conditions permettant d'éviter les problèmes de contaminations dus aux aérosols d'ADN (hotte à flux laminaire avec lampe UV).

2. Sensibilité de la N-PCR

La sensibilité de la PCR sur *X.c.c* a été évaluée à $1,6 \cdot 10^2$ bactéries/réaction après 35 cycles d'amplification et détection des produits d'amplification par électrophorèse (HARTUNG *et al.*, 1993). L'un des objectifs de cette étude est de déterminer la sensibilité de la N-PCR. De plus, nous comparerons les performances de la détection colorimétrique des produits d'amplification avec celles de la détection par électrophorèse. Les essais seront entrepris sur ADN purifié et sur cellules bactériennes.

2.1 Sensibilité de la N-PCR sur pFL1

Les essais réalisés à partir de la gamme de concentrations de pFL1 de 0,5 à $4,8 \cdot 10^5$ copies/μl permettent d'évaluer le seuil de détection de la N-PCR à environ 10 copies/réaction (Photo 5 - Tableau 7). La détection des produits d'amplification par colorimétrie semble être de sensibilité équivalente. Cependant, un problème technique ne nous a pas permis d'obtenir de données pour les concentrations 1 et 12 copies/μl.

L'analyse de variance à 1 facteur réalisée montre que la concentration en pFL1 incluse au départ en tant qu'ADN cible affecte de façon statistiquement significative la DO obtenue après détection des produits d'amplification de la deuxième série de PCR par colorimétrie ($F = 41,99$ - $p = 0,0001$). Le test de Student-Newman-Keuls effectué permet de classer les moyennes de DO en trois groupes distincts (Figure 4). Les DO les plus fortes sont obtenues lorsque l'ADN cible de départ était de $4,8 \cdot 10^4$ copies/μl. Ce résultat semblerait montrer que la N-PCR n'est pas réalisée en conditions saturantes, ce qui est contradictoire avec d'autres travaux réalisés (HARTUNG,

numéro	échantillon
1/2 et 8/9	A31 10^8 copies
3/4 et 10/11	A31 10^6 copies
4/6 et 12/13	A31 10^4 copies
7	Témoin négatif
Absence d'huile	
numéro	échantillon
16/17 et 23/24	A31 10^8 copies
18/19 et 25/26	A31 10^6 copies
20/21 et 27/28	A31 10^4 copies
22	Témoin négatif
Présence d'huile	

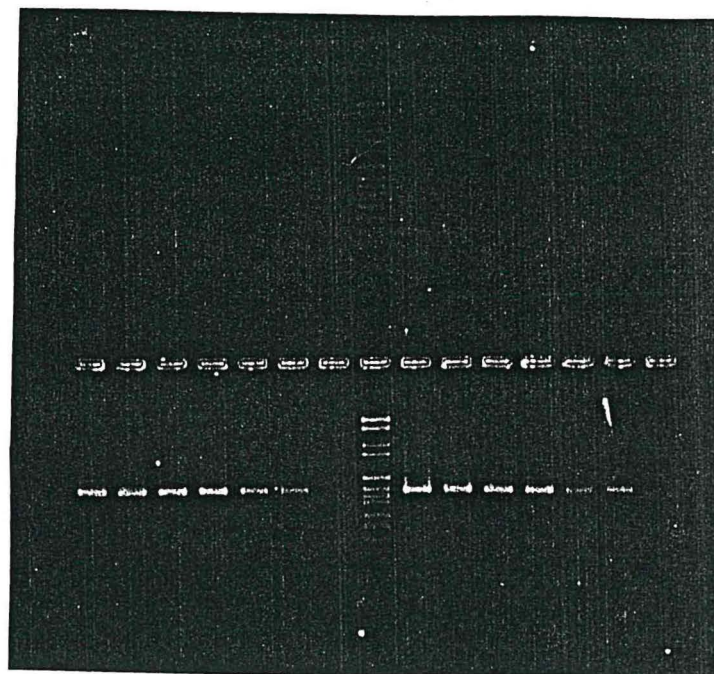


Photo 3 : Importance du contact thermique entre les tubes et le bloc chauffant de l'amplificateur.

numéro	échantillon
1 à 8	pFL1 10^6 copies
9	Témoin négatif
10 à 14	pFL1 10^6 copies
15	Marqueur VI

numéro	échantillon
16 à 29	pFL1 10^4 copies
30	Marqueur VI

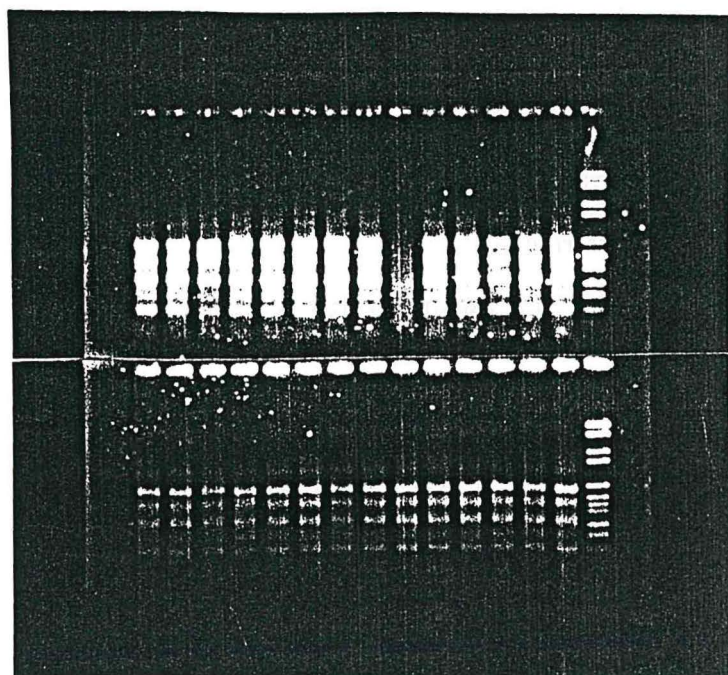


Photo 4 : Importance du démarrage à chaud

Tableau 7 : Détection de pFL1 après N-PCR par électrophorèse et colorimétrie.

Copies ^a de pFL1/ μ l	Détection par électrophorèse ^b	Colorimétrie (absorbance à 405 nm)			
		DO 1	DO 2	DO 3	Moyenne
0	-	0,020	0,031	0,033	0,028 \pm 0,007
0,5	-	0,048	0,016	0,052	0,038 \pm 0,020
1	-	/	/	/	
1,2 10 ¹	+	/	/	/	
4,8 10 ¹	+	0,256	0,285	0,335	0,292 \pm 0,040
9,6 10 ¹	+	0,451	0,463	0,484	0,466 \pm 0,017
1,9 10 ²	+	0,375	0,375	0,404	0,385 \pm 0,017
3,8 10 ²	+	0,267	0,362	0,291	0,307 \pm 0,049
3,8 10 ³	+	0,241	0,300	0,399	0,313 \pm 0,080
1,9 10 ⁴	+	0,334	0,342	0,400	0,363 \pm 0,036
4,8 10 ⁴	+	0,764	0,745	0,844	0,784 \pm 0,053

^aConcentration estimée par fluorimétrie

^bÉlectrophorèse en gel d'agarose 3 % suivie d'une coloration au bromure d'éthidium

- : Absence de bande sur le gel

+ : Présence d'une bande spécifique sur le gel.

/ : non réalisé

numéro	échantillon
1	Témoin négatif
2 à 4	4,8 10 ⁴ copies
5 à 7	1,9 10 ⁴ copies
8 à 10	3,8 10 ³ copies
11 et 12	3,8 10 ² copies
13 e 14	1,9 10 ² copies
15	96 copies
numéro	échantillon
16	96 copies
17 et 18	48 copies
19 et 20	12 copies
21	Témoin négatif
22	Marqueur VI
23 et 24	1 copie
25 et 26	0,5 copie

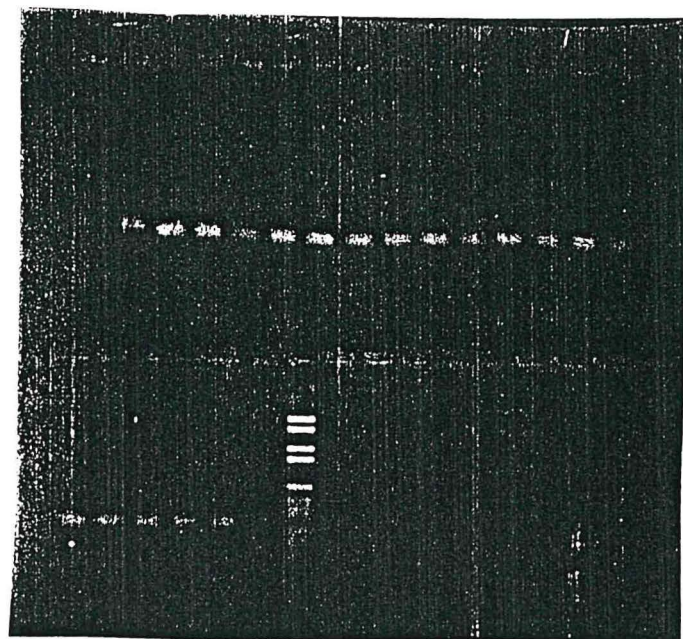
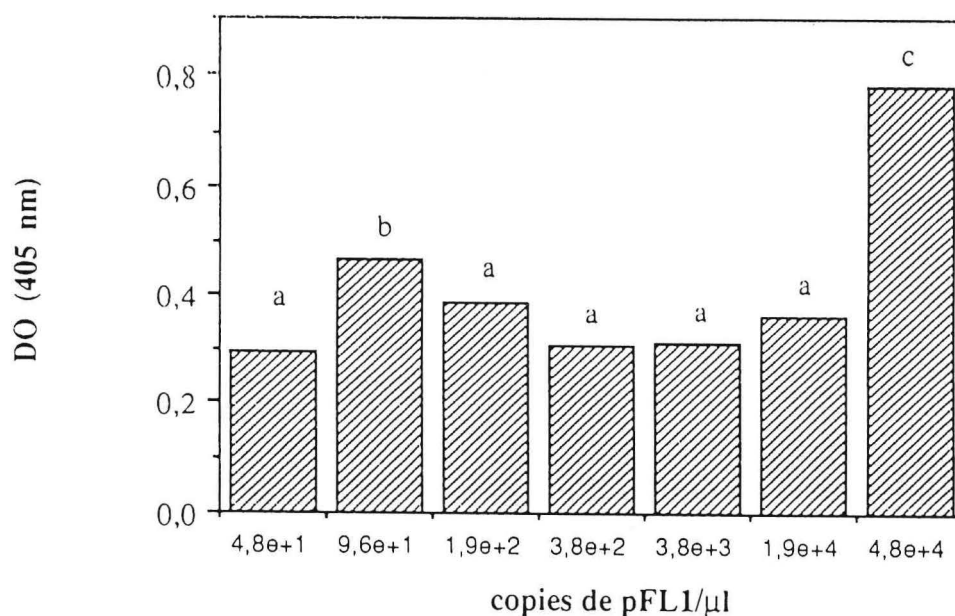


Photo 5 : Sensibilité de la N-PCR sur pFL1

Figure 4 : moyennes des DO obtenues après détection colorimétrique (pFL1 comme ADN cible).



Les moyennes représentées par des histogrammes portant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes ($p = 0,05$ - test de Student-Newman-Keuls).

Tableau 8: Détermination du nombre de bactéries par culture sur milieu SPAT.

Nombre de bactéries/ μ l ^a	Nombre de bactéries/ μ l ^b
10^4	$2,9 \cdot 10^4$
10^3	$1,53 \cdot 10^4$
$5 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^3$
10^2	$3,86 \cdot 10^2$
50	$2,31 \cdot 10^2$
10	89
1	11
0,5	4
0,1	1

^aconcentration de la suspension mère (10^8 bactéries/ml) estimée par spectrophotométrie (600nm) et dilutions successives

^bpopulations dénombrées sur milieu SPAT

communication personnelle). De plus, le fait que l'autre groupe de DO statistiquement supérieure (Figure 4) soit celui qui contenait $9,6 \cdot 10^1$ copies de pFL1 avant amplification semblerait montrer que les variations de DO obtenues seraient plutôt liées à des erreurs de manipulation. Il a été montré par ailleurs dans le cadre de notre travail que l'homogénéité de la suspension de billes magnétiques Dynabeads tout au long de la première étape de la manipulation (voir section matériel et méthodes) doit être parfaite. Ceci nécessite des agitations douces du tube mère quasi constantes, ce qui n'a pas été forcément le cas dans cette expérience.

2.2 Sensibilité de la N-PCR avec la souche de *X.c.c* JA159.1

Les essais de N-PCR sur cellules bactériennes sont réalisés à partir de suspensions de la souche JA159.1 préalablement cultivée sur milieu LPGA. La quantité de bactéries viables introduites/réaction est estimée par culture d'un aliquote de chaque dilution sur milieu SPAT (2 répétitions). Le Tableau 8 donne le résultat obtenu après numération des colonies.

La Photo 6 présente le résultat obtenu après détection électrophorétique des produits d'amplification de la N-PCR. Une amplification spécifique est obtenue pour l'ensemble des concentrations. La sensibilité de la N-PCR dans les conditions opératoires choisies pour notre étude est telle qu'elle permet de détecter 1 bactérie/réaction.

Ce résultat est confirmé par la détection colorimétrique des produits d'amplification rendue possible par l'utilisation pour la seconde série d'amplification des amorces 494.3 bio et 494.4 lac. Un signal colorimétrique positif apparaît sur plaque pour toutes les concentrations bactériennes. Ce signal traduit en absorbance donne les valeurs présentées dans le Tableau 9. Trois répétitions ont été réalisées dans le but d'apprécier la reproductibilité des résultats.

L'analyse de variance à 1 facteur réalisée montre que la concentration en cellules bactériennes incluses au départ en tant qu'ADN cible n'affecte pas de façon statistiquement significative la DO obtenue après détection des produits d'amplification de la deuxième série de PCR par colorimétrie ($F = 1,33$ - $p = 0,2925$). Les conditions expérimentales appliquées (nombre de cycles important) sont telles que les amplifications sont menées jusqu'à un niveau de saturation. L'analyse des produits d'amplification se fait lorsque la réaction a atteint son plateau d'où l'homogénéité des valeurs obtenues.

2.3 Analyse des résultats

Les résultats de la détermination de la sensibilité de la N-PCR sur ADN plasmidique purifié et sur culture bactérienne pure permettent d'émettre les conclusions suivantes :

- L'utilisation de 2 séries d'amplification permet de détecter une seule copie de la séquence cible/réaction. L'analyse de la reproductibilité des résultats rendue possible grâce à la réalisation d'un grand nombre de N-PCR sur JA159.1, montre que le seuil de détection varie en fait de 1 à 10 copies/réaction selon les expériences.

- La détection des produits d'amplification est possible sans avoir recours à l'électrophorèse grâce à l'utilisation d'amorces modifiées.

- La sensibilité de la détection colorimétrique est analogue à celle de la détection électrophorétique.

- Les étapes d'extraction de l'ADN bactérien sont inutiles : La présence de triton X100 dans le tampon de Barry et le traitement à la chaleur suffisent à lyser les cellules bactériennes.

- Les résultats obtenus restent des résultats qualitatifs traduisant la présence ou non de la séquence cible.

- L'analyse des valeurs obtenues par colorimétrie met en évidence la reproductibilité de cette technique. Les variations décrites dans le paragraphe 2.1 sont à mettre en relation avec notre inexpérience vis à vis de cette technique à la date de cette manipulation. Ces variations n'ont plus été réobtenues par la suite.

En conclusion, nous avons montré que la réalisation d'une série d'amplification supplémentaire dont le but est d'augmenter la spécificité permet aussi d'augmenter la sensibilité de la réaction PCR. Il faut cependant noter que dans les conditions expérimentales appliquées (Nombre total de cycles = 55) la détection d'une molécule/réaction exige l'absence de tous contaminants même présents en quantité infime.

Tableau 9 : Détection de JA 159.1 après N-PCR par électrophorèse et colorimétrie.

Nombre de bactéries/ réaction ^a	Électrophorèse ^b	Colorimétrie (absorbance à 405 nm)			
		DO 1	DO 2	DO 3	Moyenne
0	-	0,053	0,061	0,050	0,057±0,006
1	+	0,452	0,510	0,419	0,460±0,026
4	+	0,542	0,484	0,443	0,490±0,029
11	+	0,431	0,397	0,418	0,415±0,010
89	+	0,439	0,421	0,628	0,438±0,010
2,31 10 ²	+	0,506	0,427	0,471	0,468±0,023
3,86 10 ²	+	0,460	0,497	0,558	0,505±0,029
3,50 10 ³	+	0,455	0,443	0,630	0,509±0,060
1,53 10 ⁴	+	0,413	0,481	0,509	0,468±0,029
2,90 10 ⁴	+	0,544	0,630	0,545	0,573±0,029

^aConcentration estimée par dénombrement sur milieu SPAT

^bÉlectrophorèse en gel d'agarose 3 % suivie d'une coloration au bromure d'éthidium

- : Absence de bande sur le gel

+ : Présence d'une bande spécifique sur le gel

numéro	échantillon
1 à 3	Témoins négatifs
4	Marqueur VI
6	1 bactérie
7	4 bactéries
8	11 bactéries
9	89 bactéries
10	2,31 10 ² bactéries
11	3,86 10 ² bactéries
12	3,5 10 ³ bactéries
13	1,53 10 ⁴ bactéries
14	2,9 10 ⁴ bactéries
Dépôt 2 µl	
numéro	échantillon
23	Marqueur VI
25	2,9 10 ⁴ bactéries
26	1,53 10 ⁴ bactéries
27	3,5 10 ³ bactéries
28	3,86 10 ² bactéries
29	2,31 10 ² bactéries
Dépôt 3 µl	

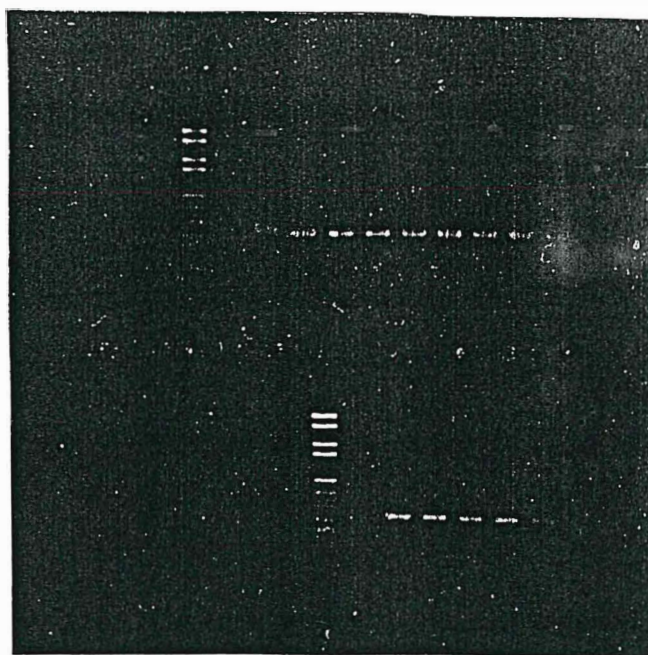
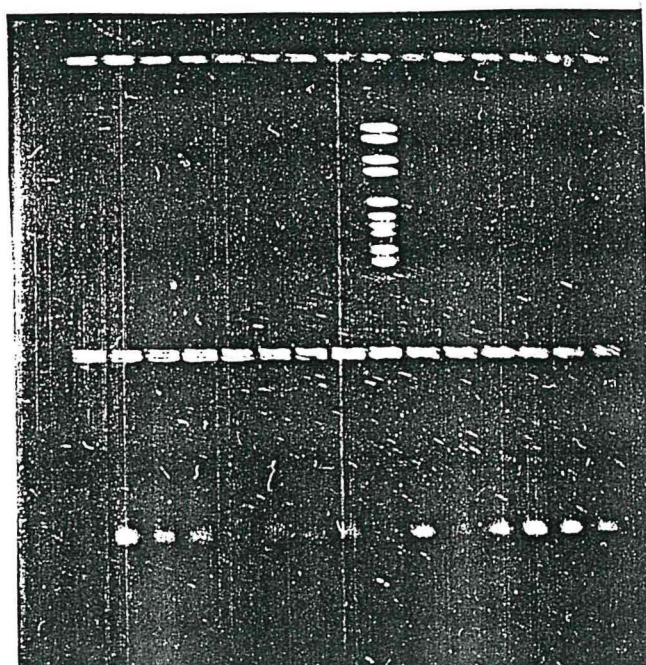


Photo 6 : Sensibilité de la N-PCR sur la souche JA159.1 de *X.c.c.*

numéro	échantillon
1	Témoin limettier de Tahiti
2	Témoin pomelo
3	Témoin combava
4	Témoin limettier mexicain
5	Témoin oranger
6	Témoin clémentinier
7	Témoin tangelo
8	Témoin négatif
9	Marqueur VI

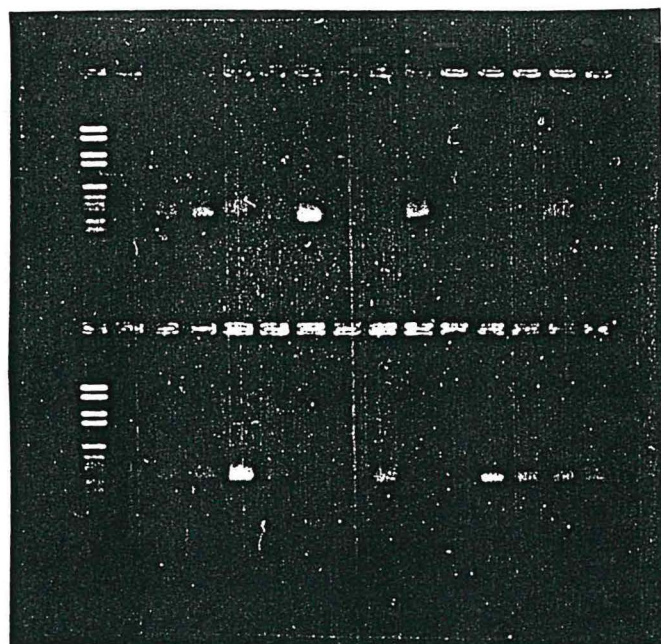
numéro	échantillon
16	Témoin négatif
17	10 bactérie
18	10 ³ bactéries
19	10 bac + limettier de Tahiti
20	10 bac + clémentinier
21	10 bac + combava
22	10 bac + oranger
23	10 bac + limettier mexicain
24	10 bac + pomelo
25	10 ³ bac + limettier de Tahiti
26	10 ³ bac + clémentinier
27	10 ³ bac + combava
28	10 ³ bac + oranger
29	10 ³ bac + limettier mexicain
30	10 ³ bac + pomelo



Photos 7 et 8 : Effets des extraits d'agrumes sur la N-PCR

numéro	échantillon
1	Marqueur VI
2 à 4	10 bac + clémentinier 1/25
5 à 7	10 bac + clémentinier 1/5
8	10 ³ bac + clémentinier
9	10 bac + clémentinier
10 et 11	Témoins limettier
12 et 13	Témoins négatifs
14	bac 10 ³
15	bac 10

numéro	échantillon
16	Marqueur VI
17 et 18	bac 103 + tangelo 1/5
19 et 20	bac 103 + tangélo
21 et 22	10 bac + tangelo 1/25
23 et 24	10 bac + tangelo 1/5
25 et 26	10 bac + tangelo
27 et 28	bac 103 + clementinier 1/25
29 et 30	bac 103 + clémentinier 1/5



3. Effet des extraits d'agrumes et du cuivre sur l'amplification

L'existence de composés inhibant la réaction d'amplification a été décrite dans la littérature, notamment en microbiologie alimentaire où certains composés présents dans la nourriture inhibent l'amplification (ROSSEN *et al.*, 1992).

En phytobactériologie, des travaux sur *Spiroplasma citri* ont montré que les extraits d'agrumes inhibent la réaction PCR (SAILLARD *et al.*, 1994).

En vue d'utiliser la N-PCR comme outil de diagnostic de *X.c.c.*, il est nécessaire de s'assurer que la matériel végétal sur lequel la bactérie est recherchée ne constitue pas un facteur limitant l'amplification.

L'effet de l'hydroxyde de cuivre, principal agent de lutte chimique contre le CBA sur la N-PCR sera lui aussi analysé.

3.1 Effet des extraits d'agrumes

7 clones de *Citrus* indemnes de *X.c.c.* ont été utilisés pour cette étude. L'absence de *X.c.c.* sur les feuilles est confirmée par N-PCR à partir d'1 µl de broyât de feuille (Photo 7).

L'introduction d'1 µl de broyâts de combava, d'oranger, de limettier de Tahiti, de pomelo ou de limettier mexicain préparés de sorte à avoir 1g de feuille pour 10 ml de tampon n'inhibent pas l'amplification que ce soit en présence de 10^1 ou de 10^3 bactéries/réaction (Photos 7 et 8 - Tableau 10).

L'introduction d'1 µl de broyâts de tangelo inhibe l'amplification uniquement pour les réactions contenant 10^1 bactéries. L'amplification n'est pas inhibée en présence de 10^3 bactéries/réaction (Photo 8 - Tableau 10).

Une inhibition totale de l'amplification quelle que soit la concentration bactérienne est obtenue avec 1 µl de broyâts de clémentinier (Photos 7 et 8 - Tableau 10).

La levée de l'inhibition induite par les broyâts de tangelo et de clémentinier est réalisée en diluant les extraits d'agrumes au 1/5 et au 1/25 avant amplification (Photo 8).

Il faut noter que la N-PCR est inhibée quelque soit le type d'agrumes par l'introduction dans le mélange réactionnel de 10 µl de broyât.

3.2 Effet du cuivre

La détection de *X.c.c.* par N-PCR est inhibée par addition d'1 µl d'une solution soluble d'hydroxyde de cuivre à 340 mg/ml. La dilution de la solution mère jusqu'au 1/10000^{ème} (34 ng/réaction) ne permet pas de lever l'inhibition. Des signaux de faible intensité sont observés pour la concentration en bactéries servant d'ADN cible de 10^3 /µl quand 3,4 ng de cuivre ou des concentrations inférieures sont présents dans le mélange réactionnel (Photo 9).

La concentration en cuivre présente sur des feuilles de clémentinier en pépinière 4 heures après traitement à raison de 250 g d'hydroxyde de cuivre/hectolitre a été déterminé. Pour cela, 20 lots de 20 feuilles traitées ont été prélevés au hasard. Les concentrations déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique sont données dans le Tableau 11. Ainsi, en traitant ces feuilles dans les conditions de l'expérience, soit 1 g pour 10 ml de tampon tris-HCl, et en introduisant 1 µl de broyât dans le mélange réactionnel, on peut estimer la concentration en cuivre à 111 ng/réaction, concentration qui inhibe l'amplification.

En résumé, le traitement par le cuivre réalisé dans les pépinières et vergers est tel qu'il rend impossible la détection par N-PCR de *X.c.c.* à partir du matériel végétal.

Une étape de purification des échantillons en vue d'éliminer les agents inhibiteurs ou de dilution (dans le cadre d'un enrichissement en bouillon nutritif par exemple) est nécessaire si on veut que la N-PCR devienne un outil de diagnostic utilisable en routine.

4. PCR quantitative

Après avoir déterminé la sensibilité de la N-PCR et vérifier l'efficacité de la détection des produits d'amplification par colorimétrie sur ADN purifié et sur cellules bactériennes, nous avons appliqué la N-PCR dans un protocole quantitatif afin d'estimer la faisabilité à estimer le nombre de molécules d'ADN présent dans l'échantillon avant amplification.

Tableau 10 : Effet des extraits d'agrumes sur la détection de la souche de *X.c.c* JA159.1 par N-PCR.

Type d'agrumes	N-PCR sur contrôle négatif : broyats d'agrumes sans JA159.1 ^a	N-PCR sur broyats d'agrumes contenant 10 ¹ 10 ³ cellules de JA159.1/réaction ^a	
Clémentinier	-	-	-
Limettier de Tahiti	-	+	+
Combava	-	+	+
Oranger	-	+	+
Pomelo	-	+	+
Tangelo	-	-	+
Limettier mexicain	-	+	+

^aÉlectrophorèse en gel d'agarose 3 % suivie d'une coloration au bromure d'éthidium

- : Absence de bande sur le gel

+ : Présence d'une bande spécifique sur le gel.

Tableau 11 : Concentrations en cuivre sur feuilles de clémentinier 4 heures après traitement.

échantillon	µg de cuivre/g de feuille
1	1259
2	1040
3	1029
4	1019
5	1162
6	1085
7	914
8	1069
9	1033
10	1173
11	1180
12	1072
13	1025
14	1081
15	1345
16	1138
17	1123
18	1145
19	1206
20	1200
Moyenne	1115

numéro	échantillon
1 et 2	Témons négatifs
3 à 5	10 bactéries
6 à 8	10 ³ bactéries
9 et 10	10 bac + 340 µg de cuivre
11 et 12	10 bac + 34 µg de cuivre
13 et 14	10 bac + 340 ng de cuivre
15	Marqueur VI
numéro	échantillon
16 et 17	10 bac + 34 ng de cuivre
18 et 19	10 bac + 3,4 ng de cuivre
20 et 21	10 ³ bac + 340 µg de cuivre
22 et 23	10 ³ bac + 34 µg de cuivre
24 et 25	10 ³ bac + 340 ng de cuivre
26 et 27	10 ³ bac + 34 ng de cuivre
28 et 29	10 ³ bac + 3,4 ng de cuivre
30	Marqueur VI

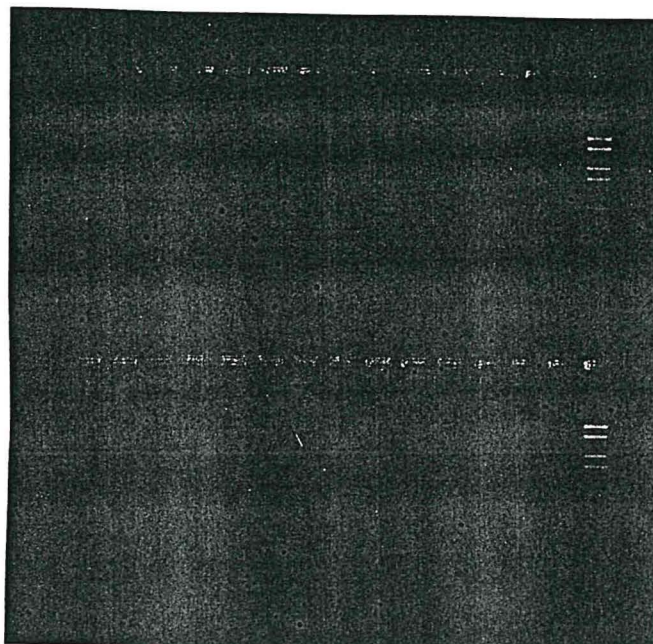


Photo 9 : Effet de l'hydroxyde de cuivre sur la N-PCR

numéro	échantillon
1	10^7 copies
2	10^6 copies
3	10^5 copies
4	10^4 copies
5	10^3 copies
6	10^2 copies
7	10 copies
8	1 copies
9	0,5 copies
10	Témoin négatif

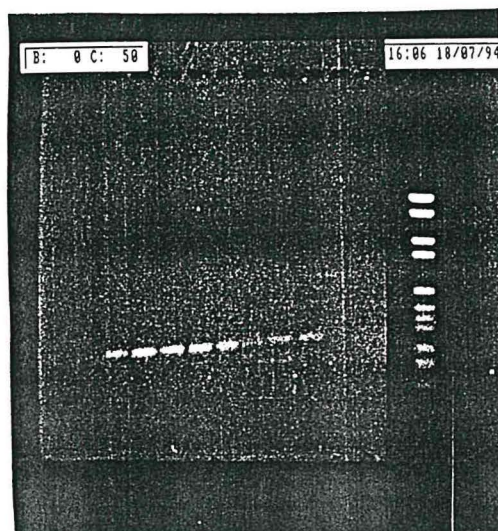


Photo 10 : Sensibilité de la N-PCR sur A31

La nouveauté de cette technique nécessite un certain nombre de mises au point. La sensibilité, la précision et la reproductibilité de ce protocole seront donc étudiées à partir d'échantillon de pFL1 et de JA159.1 de concentrations connues.

L'application de la N-PCR quantitative à l'estimation de populations de *X.c.c* dans des symptômes foliaires et dans de l'eau de pluie contaminée permettra de valider les résultats obtenus.

4.1 N-PCR sur A31

Les produits d'amplification de A31 se distinguent de ceux de pFL1 par leur taille. Les valeurs déterminées par l'analyseur de gel à l'aide du marqueur VI (Annexe 4) s'échelonnent de 429 à 437 pb ce qui correspond à la valeur attendue (431 pb).

La quantité d'ADN cible est déterminée par référence à la gamme de concentrations connues d'A31 réalisée à partir du tube mère contenant 10^{10} copies d'ADN/ μ l. Ces concentrations s'échelonnent de 10^7 à 1 copie d'ADN.

Il est indispensable de s'assurer dans un premier temps de la spécificité et de la sensibilité de la N-PCR sur A31.

La détection électrophorétique des produits d'amplification de A31 (Photo 10) confirme la spécificité des amorces et détermine le niveau de sensibilité à 1 copie/réaction.

4.2 Quantification de pFL1 par N-PCR

4 concentrations connues de pFL1 déterminées par fluorimétrie sont soumises au protocole quantitatif. Les produits d'amplification sont détectés par électrophorèse et par colorimétrie. Les concentrations de pFL1 sont déterminées à l'aide des courbes reliant les valeurs de DO de la détection colorimétrique aux différentes concentrations connues de A31. La valeur correspondant à la moitié de l'absorbance maximale se situe au point d'équivalence entre le nombre de molécules de pFL1 et d'A31.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté sur les Planches 4 et 5. Le Tableau 12 compare les valeurs obtenues par N-PCR quantitative à celles estimées par fluorimétrie. Les résultats obtenus montrent que les valeurs déterminées par N-PCR quantitative sont proches de celles attendues. Une différence plus nette est cependant observée dans le cas de la détection de 10^1 copies/ μ l. L'expérience a été répétée 3 fois (données non montrées) et des résultats analogues ont été obtenus lors des 3 répétitions. La comparaison entre les 2 techniques pour les faibles concentrations semble donc peu fiable.

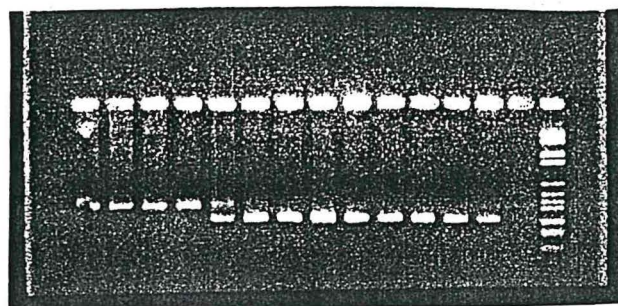
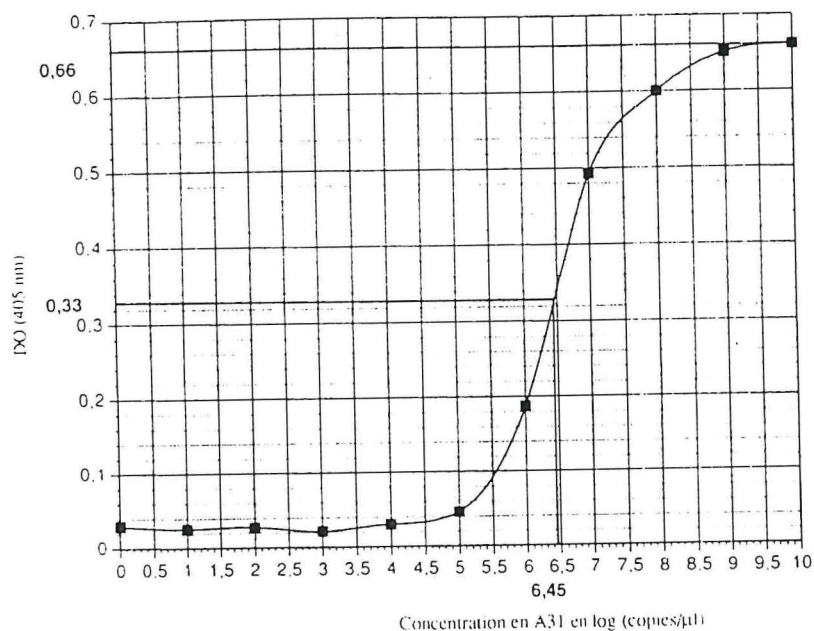
4.3 Quantification de la souche JA159.1 par N-PCR

4 concentrations bactériennes (10^1 , 10^3 , 10^5 , 10^7 bactéries/ml) ont été soumises au protocole de N-PCR quantitative. La quantité exacte de bactéries introduites dans le mélange réactionnel est déterminée par culture sur milieu SPAT d'un aliquote de chaque suspension bactérienne.

Les produits d'amplification sont détectés par électrophorèse et par colorimétrie. Les concentrations en bactérie obtenues par N-PCR sont déterminées à partir des courbes reliant les DO aux concentrations connues d'A31. L'ensemble des résultats est présenté sur les Planches 6 et 7. Le Tableau 13 compare les valeurs obtenues par spectrophotométrie et culture sur milieu LPGATS avec celles déterminées par N-PCR quantitative.

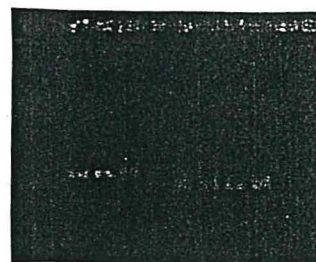
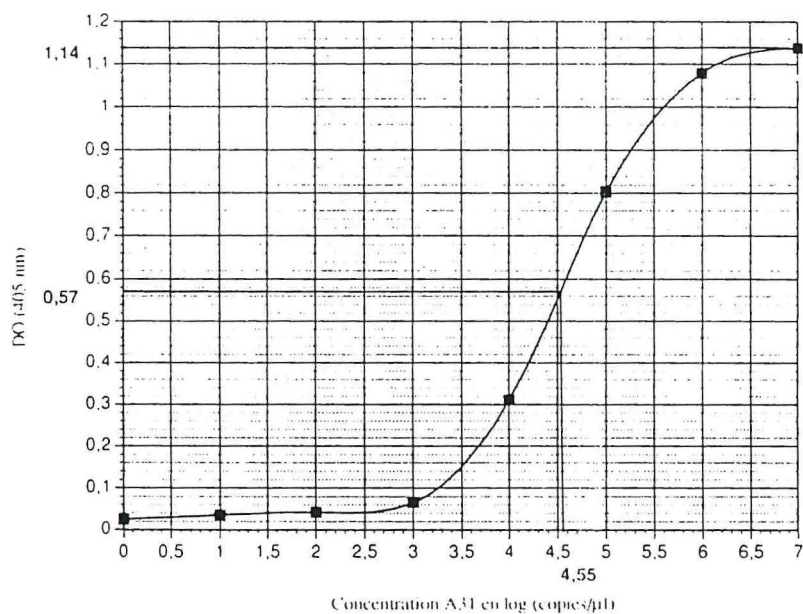
Les valeurs obtenues par N-PCR sont du même ordre de grandeur que celles attendues. Les variations entre les concentrations déterminées par N-PCR et celles estimées par spectrophotométrie sont minimales. Elles sont inférieures à celles observées entre N-PCR quantitative et dénombrement sur milieu gélosé.

Ces résultats s'expliquent par le fait que la N-PCR comme la spectrophotométrie détectent à la fois les cellules mortes et les cellules vivantes cultivables ou non (WILSON & LINDOW, 1992). La culture sur milieu gélosé ne permet de détecter que les cellules vivantes et cultivables.



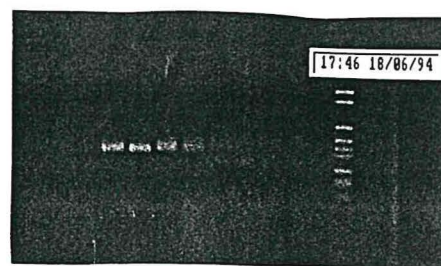
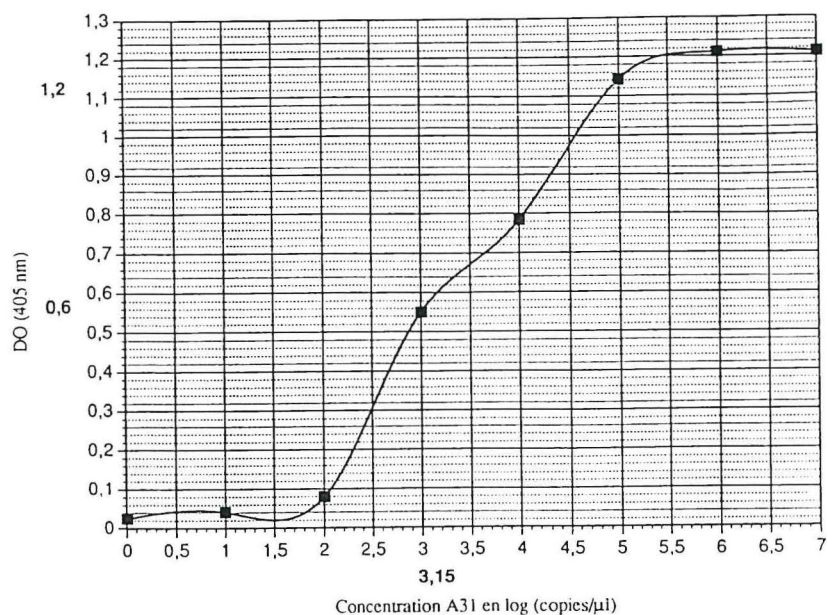
numéro	échantillon
1	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ¹⁰ copies
2	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁹ copies
3	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁸ copies
4	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁷ copies
5	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁶ copies
6	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁵ copies
7	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ⁴ copies
8	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ³ copies
9	pFL1 10 ⁷ + A31 10 ² copies
10	pFL1 10 ⁷ + A31 10 copies
11	pFL1 10 ⁷ + A31 5 copies
12	pFL1 10 ⁷ + A31 1 copie
13	pFL1 10 ⁷ + A31 0.5 copie
14	
15	Marqueur VI

N-PCR quantitative de pFL1 à 10⁷ copies / μl



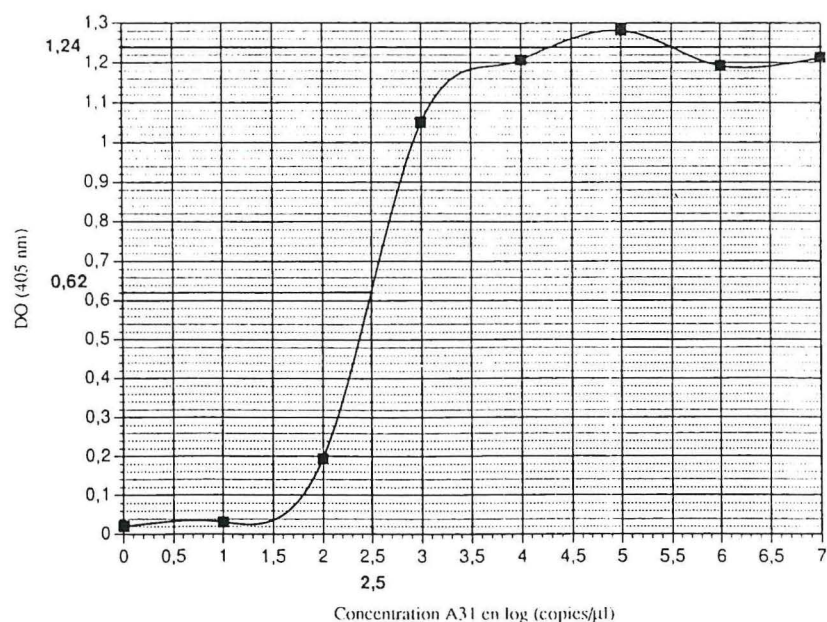
numéro	échantillon
1	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ⁷ copies
2	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ⁶ copies
3	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ⁵ copies
4	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ⁴ copies
5	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ³ copies
6	pFL1 10 ⁵ + A31 10 ² copies
7	pFL1 10 ⁵ + A31 10 copies
8	pFL1 10 ⁵ + A31 1 copie

N-PCR quantitative de pFL1 à 10⁵ copies / μl



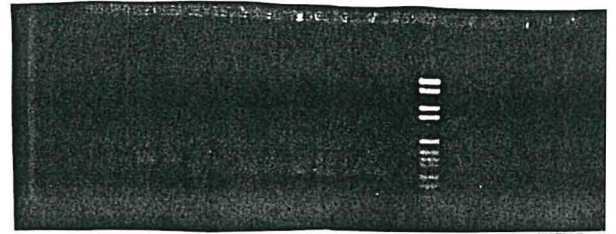
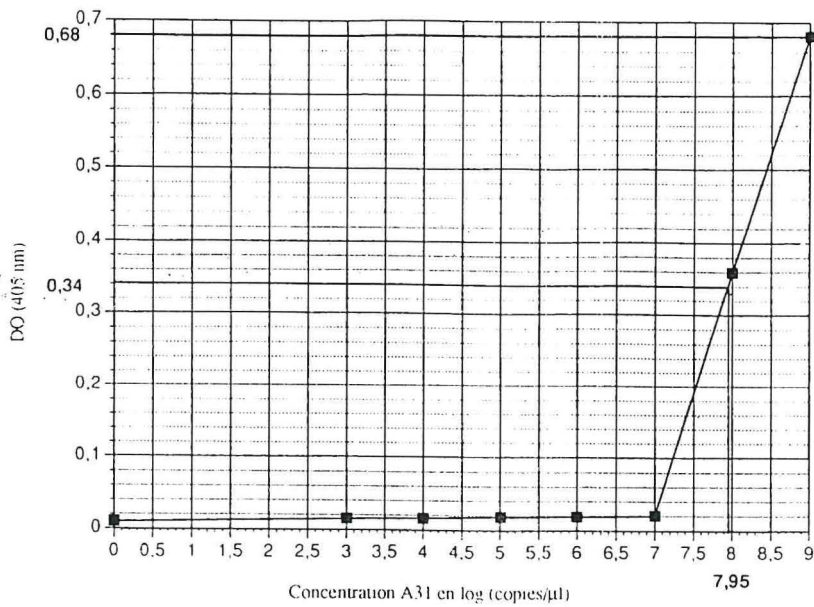
numéro	échantillon
1	pFL1 10 ³ + A31 10 ⁷ copies
2	pFL1 10 ³ + A31 10 ⁶ copies
3	pFL1 10 ³ + A31 10 ⁵ copies
4	pFL1 10 ³ + A31 10 ⁴ copies
5	pFL1 10 ³ + A31 10 ³ copies
6	pFL1 10 ³ + A31 10 ² copies
7	pFL1 10 ³ + A31 10 copies
8	pFL1 10 ³ + A31 1 copie

N-PCR quantitative de pFL1 à 10³ copies / μl



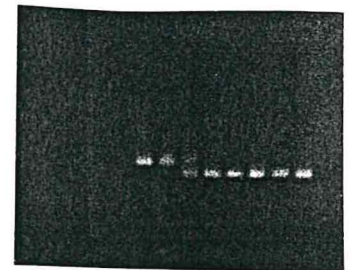
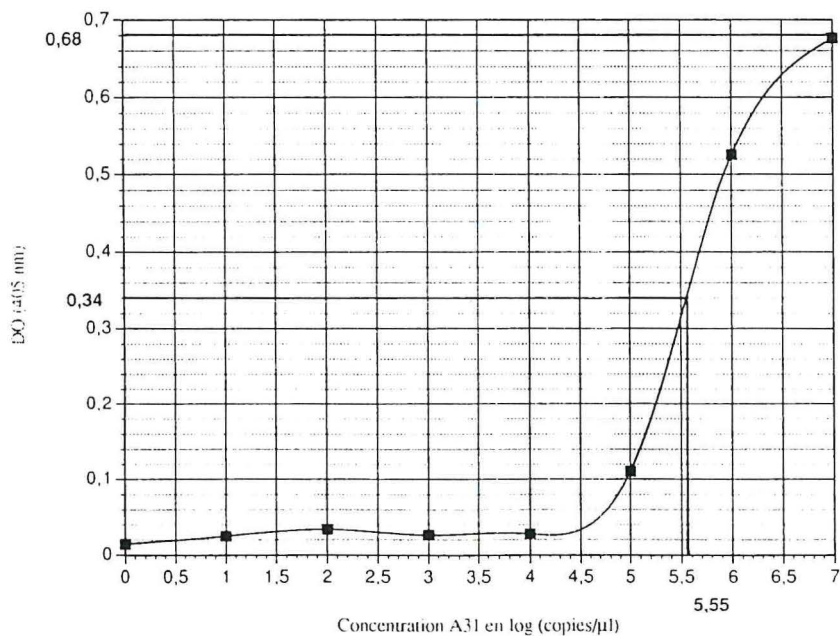
numéro	échantillon
1	pFL1 10+ A31 10 ⁷ copies
2	pFL1 10+ A31 10 ⁶ copies
3	pFL1 10+ A31 10 ⁵ copies
4	pFL1 10+ A31 10 ⁴ copies
5	pFL1 10+ A31 10 ³ copies
6	pFL1 10+ A31 10 ² copies
7	pFL1 10+ A31 10 copies
8	pFL1 10+ A31 1 copie

N-PCR quantitative de pFL1 à 10 copies / μl



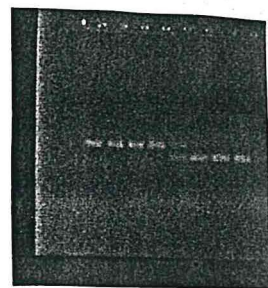
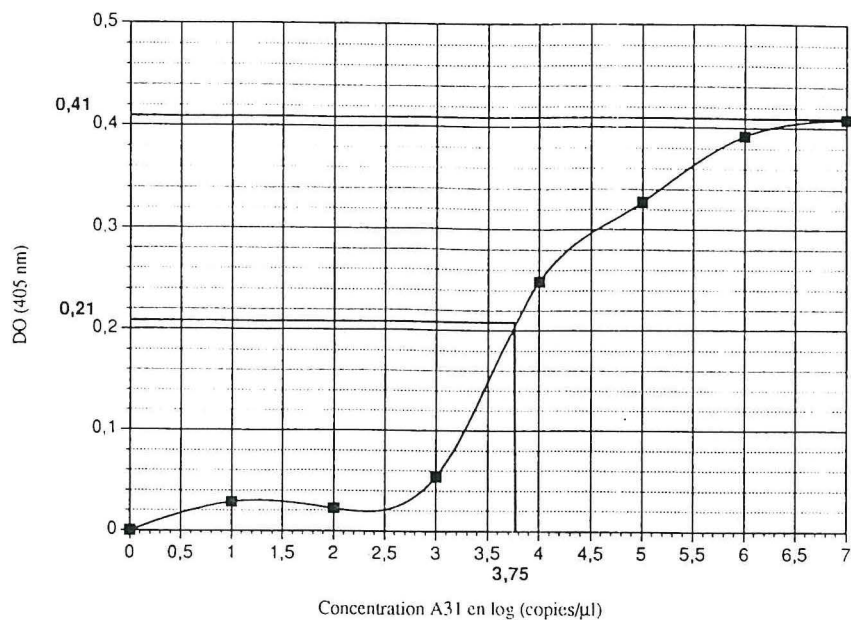
numéro	échantillon
1	bac 107 + A31 10^9
2	bac 107 + A31 10^8
3	bac 107 + A31 10^7
4	bac 107 + A31 10^6
5	bac 107 + A31 10^5
6	bac 107 + A31 10^4
7	bac 107 + A31 10^3
8	bac 107 + A31 10^2
9	bac 107 + A31 10
10	bac 107 + A31 1

N-PCR quantitative de JA159.1 à 10^7 bactéries / μl



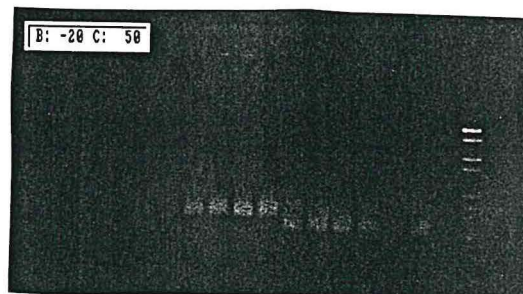
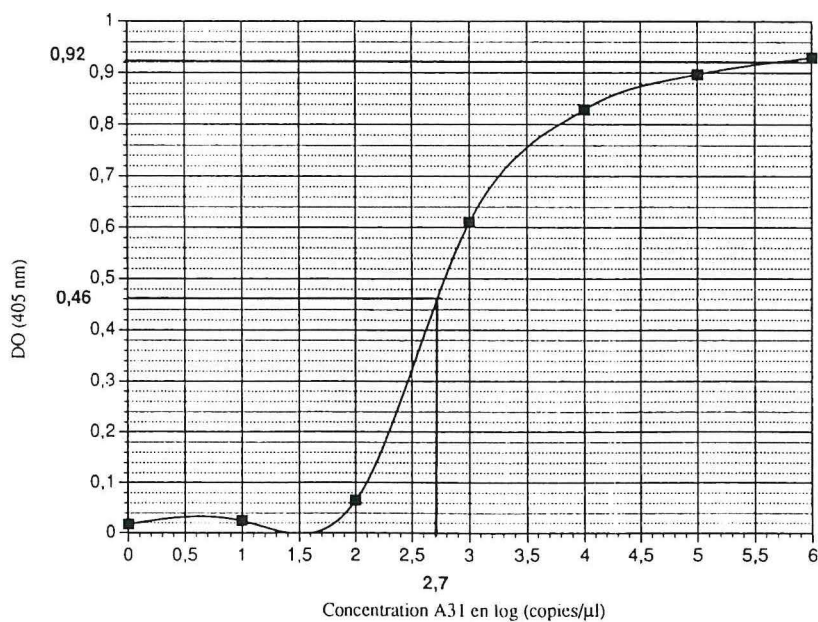
numéro	échantillon
1	bac 10^5 + A31 10^7
2	bac 10^5 + A31 10^6
3	bac 10^5 + A31 10^5
4	bac 10^5 + A31 10^4
5	bac 10^5 + A31 10^3
6	bac 10^5 + A31 10^2
7	bac 10^5 + A31 10
8	bac 10^5 + A31 1

N-PCR quantitative de JA159.1 à 10^5 bactéries / μl



numéro	échantillon
1	bac 10 ³ + A31 10 ⁷
2	bac 10 ³ + A31 10 ⁶
3	bac 10 ³ + A31 10 ⁵
4	bac 10 ³ + A31 10 ⁴
5	bac 10 ³ + A31 10 ³
6	bac 10 ³ + A31 10 ²
7	bac 10 ³ + A31 10
8	bac 10 ³ + A31 1

N-PCR quantitative de JA159.1 à 10³ bactéries / μl



numéro	échantillon
1	bac 10 + A31 10 ⁶
2	bac 10 + A31 10 ⁵
3	bac 10 + A31 10 ⁴
4	bac 10 + A31 10 ³
5	bac 10 + A31 10 ²
6	bac 10 + A31 10
7	bac 10 + A31 5
8	bac 10 + A31 1
9	bac 10 + A31 0,5
10	bac 10 + A31 0,1

N-PCR quantitative de JA159.1 à 10 bactéries / μl

Tableau 12 : Concentration de pFL1 déterminées par N-PCR quantitative.

Concentration estimée par fluorimétrie (copies/ μ l)	Concentration déterminée par N-PCR quantitative (copies/ μ l)
10^7	$1,26 \cdot 10^6$
10^5	$3,50 \cdot 10^4$
10^3	$1,40 \cdot 10^3$
10^1	$2,81 \cdot 10^2$

Tableau 13 : Concentration de JA159.1 déterminées par N-PCR quantitative.

Spectrophotométrie ^a (X.c.c/ μ l)	Dénombrement sur milieu gélosé (X.c.c/ μ l)	N-PCR quantitative (X.c.c/ μ l)
10^7	$8,7 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^7$
10^5	$8,7 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^5$
10^3	$3,7 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^3$
10^1	4,4	$5 \cdot 10^2$

^aconcentration de la suspension mère (10^8 bactéries/ml) estimée par spectrophotométrie (600nm) et dilutions successives

^bpopulations dénombrées sur milieu SPAT

4.4 Analyse des résultats

Les résultats de N-PCR quantitative obtenus avec pFL1 et la souche JA159.1 permettent de formuler les conclusions suivantes :

- Les méthodes de quantification des bactéries ou de l'ADN (spectrophotométrie, comptage sur milieu SPAT et fluorimétrie) donnent des résultats compatibles avec les valeurs obtenues par N-PCR quantitative et confirment la fiabilité de notre protocole pour des objectifs de quantification. La quantification par N-PCR reste cependant approximative malgré l'obtention de valeurs précises.

- La différence de taille des produits d'amplification permet de visualiser le phénomène de compétition et d'estimer directement à partir du gel la concentration de l'ADN à quantifier. La valeur estimée reste néanmoins très approximative ; une meilleure précision est obtenue en analysant les produits d'amplification par colorimétrie qui donne un résultat numérique.

- Il a été confirmé par les expériences de N-PCR quantitative que les performances de la détection des produits d'amplification par colorimétrie sont identiques à celles de la détection par électrophorèse.

- La lourdeur opératoire de la détection colorimétrique empêchera très probablement son utilisation à grande échelle pour du diagnostic de routine ou pour des travaux d'écologie microbienne.

5. Application de la N-PCR qualitative et quantitative à l'étude de la dissémination de *X.c.c* par la pluie

Les populations de bactériennes présentes dans les symptômes des plants malades servant de foyer ont été évaluées après mise en culture d'un aliquote de broyats de lésions sur milieu LPGATS. Les résultats obtenus (Tableau 14) montrent que juste avant le début de l'expérimentation, les populations bactériennes étaient de l'ordre de 10^7 bactéries/lésion. Par contre, tous les plants considérés sains, ne présentaient pas de populations de *X.c.c* résistantes ou non à la streptomycine (vérification par étalements d'aliquotes sur milieu LPGATS et SPATKCA).

5.1 Suivi de la dissémination sous l'effet d'une pluie fine

Les résultats de la détection de *X.c.c* dans l'eau présente à la surface des feuilles des plants sains et du plant contaminé après traitement par 30 minutes de pluie fine sont présentés dans le Tableau 15.

La position des plants sains autour du plant malade (C3) ainsi que leur concentration respective en bactéries suite au dénombrement sur milieu LPGATS sont schématisées sur la Figure 5.

La présence de *X.c.c* dans l'eau de pluie à la surface des feuilles n'est détectée que pour un unique plant à proximité du plant malade. La dispersion de la bactérie par une pluie fine semble donc être très faible.

Le seuil de détection de la N-PCR, comme nous l'avons montré, varie de 1 à 10 bactéries/réaction soit 10^3 à 10^4 cellules/ml. Au vu des résultats du dénombrement sur milieu LPGATS, il est impossible de réaliser la N-PCR directement sur l'eau de pluie prélevée à la surface des feuilles des plants sains. En effet, la quantité de bactérie est inférieure à la limite de détection de la N-PCR.

Une étape d'enrichissement des prélèvements a donc été réalisée afin d'augmenter le nombre de bactéries. Pour cela, la présence d'au moins 1 bactérie dans les 10 μ l d'eau introduit dans le bouillon sélectif soit 10^2 bactéries par ml est nécessaire. Au préalable, nous avons vérifié la réactivité de la souche C40S par N-PCR. De plus, l'eau utilisée pour cette étude a été soumise à l'amplification afin de s'assurer de la spécificité de notre technique. Aucune amplification n'a été mise en évidence.

La présence de *X.c.c* dans l'eau de pluie à la surface des feuilles du plant malade (C3) est détectée par N-PCR (Tableau 15 - Figure 5).

La présence de *X.c.c* sur le plant sain n°23 n'est pas confirmée par la N-PCR même après 72 heures d'enrichissement (Tableau 15).

L'absence de *X.c.c* sur les autres plants est confirmée après 72 heures d'enrichissement. Quelques résultats faiblement positifs après 24 ou 48 heures d'enrichissement (bande de faible

Tableau 14 : Populations de *X.c.c* présentes dans les lésions foliaires avant le début des précipitations.

Descriptif	Dénombrement sur LPGATS	
	(log <i>X.c.c</i> /ml)	(log <i>X.c.c</i> /lésion)
Feuille malade 1	6,75	7,10
Feuille malade 2	6,17	6,52
Feuille malade 3	6,77	7,12
Feuille malade 4	7,39	7,74
Feuilles saines	ND ^a	ND

^aND : non détecté (sensibilité de la technique = 45 bactéries/feuille)

Tableau 15 : Populations de *X.c.c* présentes dans l'eau de pluie après 30 minutes de pluie fine.

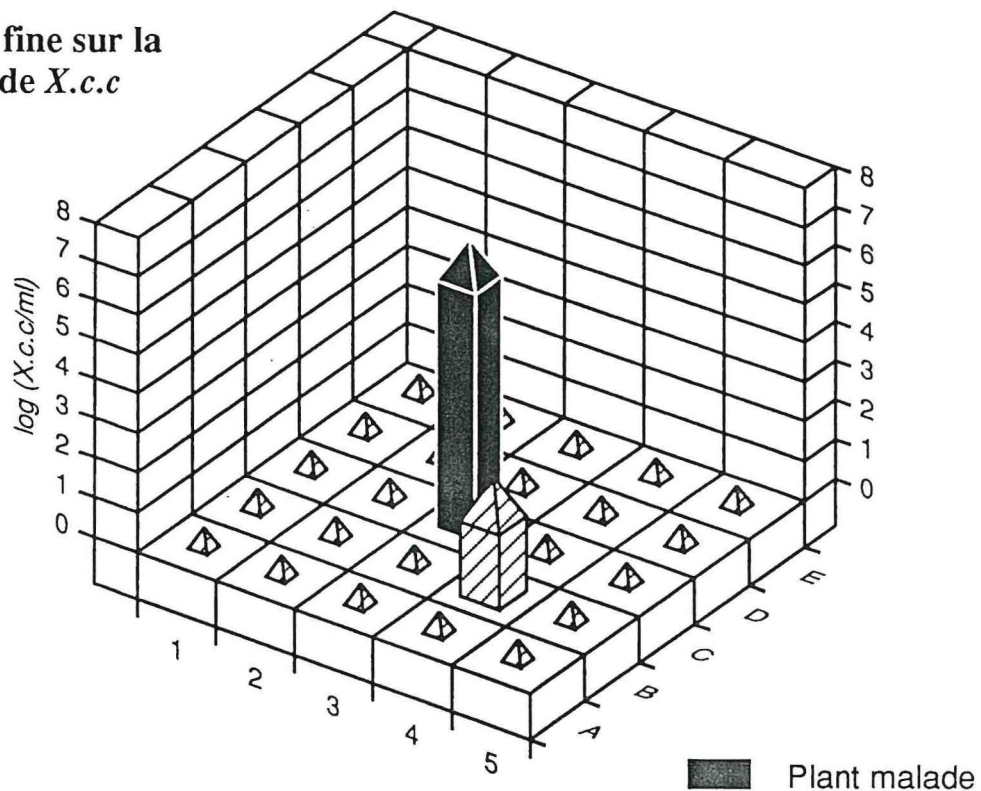
Descriptif	Dénombrement sur LPGATS log (<i>X.c.c</i> /ml)	N-PCR après enrichissement		
		Durée de l'enrichissement		
		24 h	48h	72h
A1	ND ^a	-	-	-
A2	ND	-	-	-
A3	ND	+	-	-
A4	ND	-	-	-
A5	ND	-	-	-
B1	ND	-	-	-
B2	ND	-	-	-
B3	ND	-	-	-
B4	2,89	-	-	-
B5	ND	-	-	-
C1	ND	-	-	-
C2	ND	-	+	-
C3	7,33	+	+	+
C4	ND	-	-	-
C5	ND	-	-	-
D1	ND	-	+	-
D2	ND	-	+	-
D3	ND	-	-	-
D4	ND	-	-	-
D5	ND	-	-	-
E1	ND	-	-	-
E2	ND	-	-	-
E3	ND	-	-	-
E4	ND	-	-	-
E5	ND	-	-	-

^aND : non détecté (sensibilité de la technique = 45 bactéries/feuille)

+: Présence de la bande spécifique de *X.c.c* après électrophorèse des produits d'amplification et coloration du gel au bromure d'éthidium.

- : Absence de la bande spécifique.

Effet d'une pluie fine sur la
dissémination de *X.c.c*



Effet d'une pluie forte sur la
dissémination de *X.c.c*

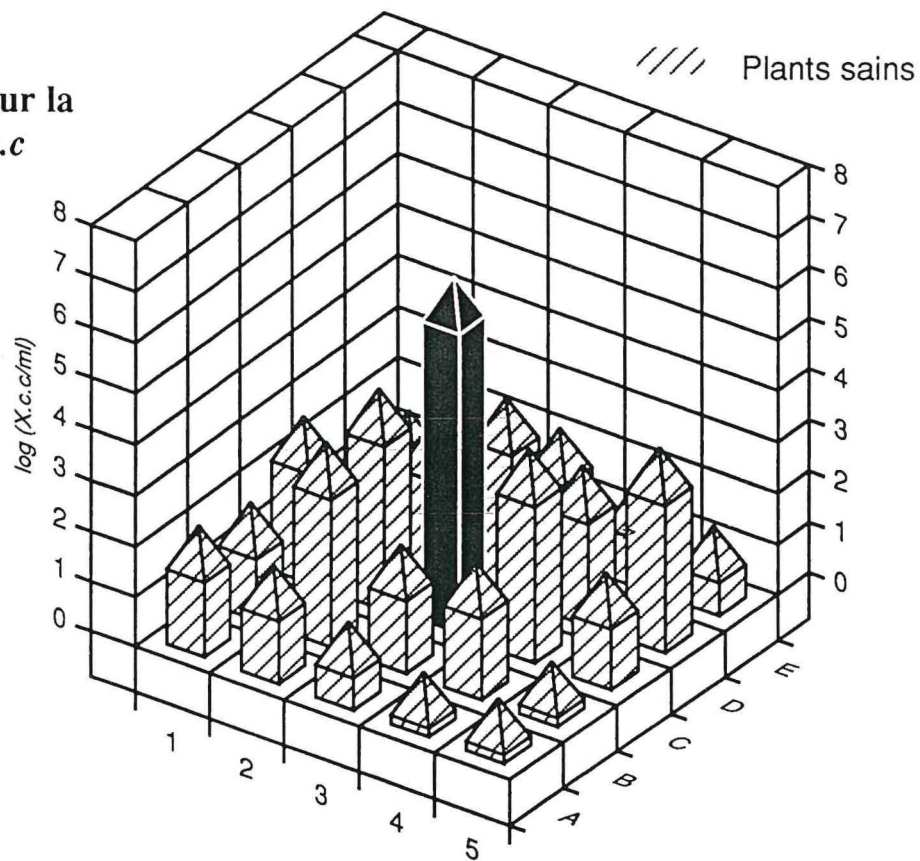


Figure 5 : Détection et quantification de *X.c.c* sur les plants sains par culture sur milieu sélectif.

intensité de 295 pb) n'a pas été confirmée après 72 heures d'enrichissement. Il est probable qu'il s'agisse de pollutions par *X.c.c.* au moment de l'ensemencement des tubes d'enrichissement, car aucun des témoins négatifs des N-PCR effectuées ne s'est révélé positif.

5.2 Suivi de la dissémination sous l'effet d'une pluie de forte intensité

Les résultats de la détection de *X.c.c.* dans l'eau prélevée à la surface des feuilles des plants sains et du plant malade sont résumés dans le Tableau 16.

La représentation schématique de la position des bactéries à partir du plant malade montre l'effet de dissémination induit par l'application d'une pluie de forte intensité sur les plants (Figure 5).

La présence de bactéries est détectée sur tous les plants sains par la technique d'isolement sur milieu LPGATS.

A 24 heures d'enrichissement, la N-PCR ne détecte que les bactéries présentes dans l'eau du plant malade. Aucune amplification n'est observée pour l'eau des plants sains.

Ces résultats montrent que la technique d'isolement sur milieu sélectif est plus sensible que la N-PCR. Des concentrations de l'ordre de 10^1 bactéries/ml sont détectées par isolement ce qui impossible par PCR avec les conditions utilisées dans cette expérience.

A 48 heures d'enrichissement, la présence de *X.c.c.* est détectée dans l'eau de 2 plants sains sur les 24 testés.

A 72 heures d'enrichissement, on détecte la présence de la bactérie sur 11 plants sains.

Si on compare le nombre de bactéries déterminé par culture avec l'apparition d'un signal positif par N-PCR, on remarque qu'en général les échantillons contenant les plus fortes concentrations de *X.c.c.* sont détectés par N-PCR après 72 heures d'enrichissement.

En théorie, dans nos conditions, tous les échantillons contenant au moins 10^2 cellules de *X.c.c.* devraient être positifs en N-PCR. Si l'on applique cette règle, il n'existerait que 52 % de similitude entre les 2 techniques comparées. Les populations bactériennes ont été dénombrées sur milieu LPGATS.

8 échantillons qui auraient en théorie dû être positifs se sont avérés être négatifs. Il est connu que plusieurs genres bactériens sont antagonistes de *X.c.c.* (par exemple *Bacillus* et *Pseudomonas* spp.). Il a été montré *in vitro* qu'ils produisent des composés diffusibles inhibant la croissance de *X.c.c.* (VERNIERE, 1992). Il est possible que ce phénomène d'antagonismes microbiens soit à l'origine de la non détection de *X.c.c.* par N-PCR dans ces échantillons. En effet, le bouillon SPKCA utilisé est un bouillon semisélectif et non sélectif ; c'est à dire que d'autres bactéries présentes en épiphytes à la surface des organes aériens des agrumes ou dans l'eau ont l'aptitude de croître dans ce bouillon nutritif.

A l'inverse, 4 échantillons qui auraient en théorie dû être négatifs se sont avérés être positifs. Comme dans l'expérience décrite dans le paragraphe 5.1, il est possible qu'il s'agisse de pollutions par *X.c.c.* au moment de l'ensemencement des tubes d'enrichissement, la contamination par 1 bactérie étant en théorie suffisante. De plus, le taux de reprise des bactéries quelles qu'elles soient sur les milieux semisélectifs n'étant jamais de 100 % (RUDOLPH *et al.*, 1990), on peut imaginer que les populations de C40S aient pu être sous estimés par dénombrement sur le milieu LPGATS, ce qui pourrait expliquer que des échantillons positifs par culture mais semblant contenir moins de 10^2 cellules de *X.c.c.* soient positifs en N-PCR.

C'est donc probablement le cumul de plusieurs sources d'erreur qui a donc conduit à un taux de similitude relativement faible entre les 2 techniques.

5.3 Quantification de *X.c.c.* sur les plants malades après traitement par la pluie

La quantification de *X.c.c.* a été réalisée dans l'eau présente en surface des feuilles et à partir des broyats de lésions par dénombrement sur milieu sélectif et par N-PCR quantitative.

Les résultats du dénombrement bactérien sur milieu LPGATS montrent que les variations entre les populations de *X.c.c.* présentes avant traitement par la pluie et après traitement (Tableau 17) sont peu différentes. Elles ne sont pas statistiquement significatives (analyse de variance).

La quantification par N-PCR a été réalisée sur 2 lésions ainsi que sur l'eau prélevée sur les feuilles des plants malades. La Planche 8 montre les résultats obtenus après détection des produits d'amplification par électrophorèse et par colorimétrie. Le manque de temps nous a permis de

Tableau 16 : Populations de *X.c.c* présentes dans l'eau de pluie après 30 minutes de pluie forte.

Descriptif	Dénombrement sur LPGATS log (<i>X.c.c</i> /ml)	N-PCR après enrichissement		
		Durée de l'enrichissement		
		24 h	48h	72h
A1	2,32	-	-	-
A2	2,08	-	-	-
A3	1,48	-	-	-
A4	1,00	-	-	-
A5	1,00	-	-	-
B1	2,04	-	-	-
B2	3,75	-	-	+
B3	2,28	-	-	+
B4	2,45	-	-	+
B5	1,00	-	-	-
C1	2,97	-	-	-
C2	4,04	-	+	+
C3	6,78	+	+	+
C4	3,94	-	-	+
C5	2,05	-	-	-
D1	1,70	-	-	+
D2	2,60	-	-	-
D3	3,65	-	-	-
D4	2,86	-	-	+
D5	3,75	-	-	+
E1	1,60	-	-	+
E2	1,60	-	-	-
E3	2,32	-	-	-
E4	1,78	-	-	+
E5	1,48	-	-	+

+ : Présence de la bande spécifique de *X.c.c* après électrophorèse des produits d'amplification et coloration du gel au Bromure d'Ethidium.

- : Absence de la bande spécifique de *X.c.c*.

>

Tableau 17 : Populations de *X.c.c* présentes dans les symptômes foliaires avant et après traitement.

Descriptif	Populations initiales $\log(X.c.c/ml)$	Populations après pluie fine $\log(X.c.c/ml)$	Populations après pluie forte $\log(X.c.c/ml)$
Lésion 1	6,75	6,68	7,12
Lésion 2	6,17	7,31	7,54
Lésion 3	6,77	7,16	7,20
Lésion 4	7,39	7,09	6,44
eau	ND ^a	7,33	6,78

^aND : non détecté (sensibilité de la technique = 45 bactéries/feuille)

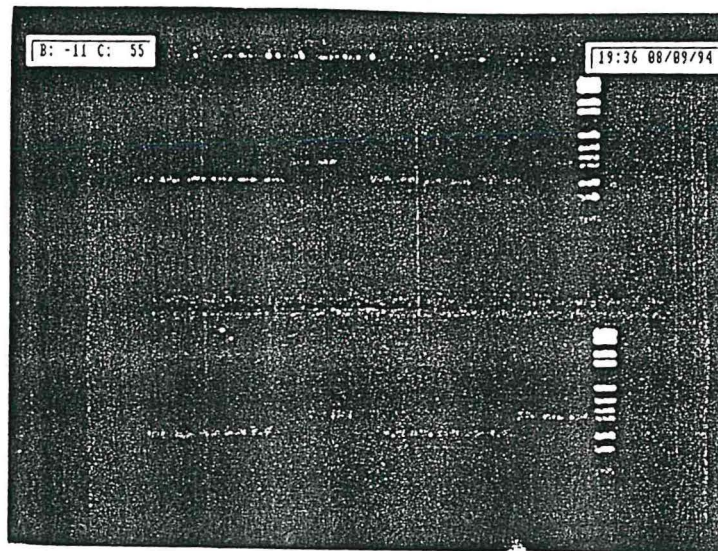
Tableau 18 : Populations de *X.c.c* détectées à partir de lésions foliaires et d'eau de pluie contaminée par dénombrement sur milieu sélectif et par N-PCR.

Descriptif	Dénombrement sur LPGATS $\log(X.c.c/ml)$	Dénombrement par N-PCR $\log(X.c.c/ml)$
eau (pluie fine)	7,33	8
eau (pluie forte)	6,78	7,65*
lésion 3 (pluie fine)	7,16	7
lésion 4 (pluie forte)	6,44	8

*concentration déterminée par détection colorimétrique

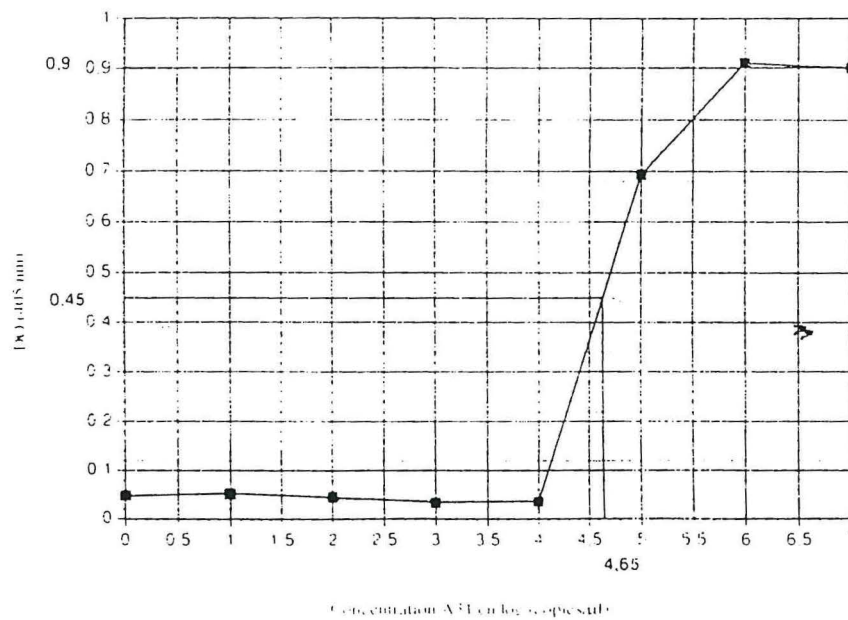
eau (pluie fine)

lésion 4



eau (pluie forte)

lésion 3



Détection colorimétrique des produits d'amplification (cas : eau-pluie forte)

PLANCHE 8 : N-PCR quantitative sur l'eau et sur les lésions du plant
malade.

réaliser qu'une seule détection colorimétrique aussi la concentration en bactéries des autres essais est estimée directement à partir des résultats obtenus sur gel, mais les expériences décrites dans le paragraphe 4 ont montré que les résultats obtenus par les 2 techniques avaient une très bonne concordance.

Le Tableau 18 compare les valeurs obtenues par isolement sur milieu sélectif et par N-PCR. Les valeurs obtenues sont généralement supérieures à celles déterminées par culture sur boîte.. Comme il a déjà été signalé dans le paragraphe précédent, il convient de noter que la N-PCR a l'aptitude à détecter cellules mortes, cellules vivantes et cultivables, ainsi que les cellules vivantes mais non cultivables, ce qui pourrait expliquer les variations obtenues.

DISCUSSION

Les objectifs de cette étude étaient :

- La détermination de la sensibilité de la N-PCR sur ADN plasmidique purifié et sur culture pure de *X.c.c.*
- La comparaison des performances de la détection électrophorétique des produits d'amplification avec une technique de détection colorimétrique.
- L'étude de l'efficacité de la N-PCR en présence de broyât d'agrumes et de cuivre.
- La mise au point d'un protocole de N-PCR quantitative
- La validation de l'efficacité de la N-PCR qualitative et quantitative dans le cadre d'une expérience d'écologie microbienne.

Dans les conditions opératoires choisies pour notre étude, nous avons montré que la N-PCR permet de détecter 1 à 10 copies de la séquence cible. Un même ordre de sensibilité ne peut être obtenue que par hybridation avec une sonde marquée, technique plus longue et plus laborieuse que la N-PCR.

L'avantage de cette PCR en 2 étapes est l'augmentation de spécificité et de sensibilité par rapport à la PCR en une étape développée par HARTUNG *et al.* en 1993 dont le seuil de détection a été évalué à $1,6 \cdot 10^2$ cellules de *X.c.c.*

La spécificité est assurée par l'utilisation de 2 paires d'amorces dont l'une, interne, n'ira se fixer que sur les produits spécifiques de la première série d'amplification. De plus, la diminution du nombre de cycles dans la seconde série d'amplification élimine le risque d'obtenir des fausses réactions positives.

Les amorces utilisées dans cette étude sont spécifiques de toutes les souches de *X.c.c.* de pathotype A. Elles reconnaissent les variants de *X.c.c.* de pathotype A originaires du Moyen Orient (VERNIERE *et al.*, 1994) (HARTUNG, communication personnelle), ce qui constitue un "plus" indéniable par rapport aux techniques sérologiques. En effet, ces souches du Moyen Orient ne sont reconnues ni par l'anticorps monoclonal A1 (ALVAREZ *et al.*, 1991) censé être spécifique du pathotype A, ni par les différents anticorps polyclonaux préparés par différentes équipes de recherche intéressées par le chancre bactérien des agrumes (VERNIERE *et al.*, 1994). A ce jour, aucun anticorps monoclonal ne reconnaît toutes les souches variantes originaires du Moyen Orient.

Les amorces utilisées pour la N-PCR n'engendrent aucun produit d'amplification avec les autres pathovars de *X. campestris*. à l'exception de *X. campestris* pv. *vignicola* et *bilvae* (HARTUNG *et al.*, 1993) qui sont absents de l'Île de la Réunion.

On peut conclure que les conditions de la N-PCR appliquées dans notre étude permettent d'atteindre des niveaux de sensibilité et de spécificité supérieurs à ceux obtenus par les autres techniques de détection telles que l'ELISA (sensibilité de l'ordre de 10^5 à 10^6 cellules/ml) couramment utilisées pour la détection de *X.c.c.* L'immunofluorescence indirecte présente des niveaux de sensibilité comparables à la N-PCR, mais les observations au microscope à épifluorescence sont extrêmement fatigantes pour l'utilisateur, ce qui rend impossible l'utilisation en routine de cette technique.

Il faut cependant noter que les résultats alliant spécificité et haute sensibilité ont été obtenus à partir de cultures bactériennes pures et d'ADN plasmidique purifié. Un tel seuil de sensibilité (1 bactérie/réaction) exige l'absence totale de tous contaminants même présents en quantité infime. Or, le fait même de rajouter une série d'amplification augmente le nombre de manipulations et donc le risque de contaminations.

La détection de *X.c.c.* à partir de matériel végétal contaminé (dans le cadre de l'étude de la dissémination de la bactérie par la pluie) a parfois révélé la présence de fausses réactions positives parmi les témoins négatifs gênant l'interprétation des résultats. L'équilibre entre spécificité et sensibilité obtenu lors de la mise au point de la N-PCR n'est pas toujours conservé lorsque qu'on applique la technique directement sur du matériel végétal contaminé. Il semble donc indispensable afin d'utiliser la N-PCR en routine de modifier les conditions opératoires choisies pour notre étude. Le nombre de cycle d'amplification devrait donc être diminué afin de conserver la spécificité de la technique, au prix de voir la sensibilité diminuer légèrement.

La détection d'une si faible quantité de *X.c.c* pourrait être facilitée par le fait que la séquence cible est plasmidique. En effet, il a été montré que la détection par PCR de séquences plasmidiques est 10 à 1000 fois plus sensible que la détection par PCR de séquences génomiques chez *Chlamydia trachomatis*. Cette différence est due à la présence en plusieurs copies du plasmide dans les cellules de *Chlamydia* (MAHONY *et al.*, 1993). Aucune publication ne mentionne cependant le nombre de copies des plasmides chez les *Xanthomonas*. Les quantités d'ADN plasmidique extraites lors de "minipreps" montrent cependant que le nombre de copies est probablement assez faible, en tout cas nettement inférieur à celui rencontré chez *E. coli*.

Les résultats obtenus avec le kit DIANA démontrent que des séquences d'ADN spécifiques peuvent être détectées en l'absence d'information concernant leur taille ou leur séquence comme l'exige la détection par électrophorèse ou par hybridation.

Le principe de cette détection réside dans la modification des amorces utilisées pour la N-PCR sans changer leur spécificité.

Le protocole décrit utilise le fait que les fragments d'ADN double brin produits par la N-PCR portent à leur extrémité un résidu biotine et la séquence de l'opérateur *lac* provenant de l'opéron lactose d'*E. coli*.

La détection colorimétrique repose sur la fixation de la protéine de fusion (répresseur *lac* - β galactosidase) au niveau de la séquence de l'opérateur *lac*. L'ajout du substrat de l'enzyme, l'ONPG, entraîne l'apparition d'une couleur jaune.

La séquence de l'opérateur *lac* est présente en une seule copie sur l'amorce 494.4 pour la N-PCR qualitative et en 4 copies dans la séquence de l'ADN compétiteur (A31) pour la N-PCR quantitative. Les DO maximales obtenues pour les essais de N-PCR quantitative sont supérieures à celles obtenues pour les essais de N-PCR qualitative, traduisant un plus grand nombre de copies de l'opérateur *lac*. Une plus grande quantité de protéine de fusion se fixe probablement à la séquence cible pour la N-PCR quantitative. Cependant, les valeurs de cet essai ne sont pas 4 fois supérieures ce qui laisse penser que la quantité de protéine de fusion ou de substrat chromogénique est un facteur limitant. Lors des expériences de N-PCR qualitative, la protéine de fusion et le substrat serait donc en quantité suffisante pour que les conditions soient saturantes. Ce ne serait pas le cas dans les expériences de N-PCR quantitative. Il serait intéressant de réaliser des essais de N-PCR quantitative en conditions de protéine de fusion ou de substrat saturantes pour valider les résultats de notre étude.

La qualité de la détection colorimétrique repose sur l'homogénéité des billes magnétiques dont la quantité doit être constante tout au long de la manipulation. Ceci demande beaucoup de précautions lors des manipulations. L'absence de variations significatives pour un même échantillon n'a été obtenue qu'après réalisation d'un grand nombre de détections colorimétriques.

La comparaison avec la détection par électrophorèse montre que ces 2 techniques donnent exactement les mêmes résultats et ont la même sensibilité. La présence d'une bande de 295 pb sur gel est confirmée par la présence d'un signal colorimétrique fort et inversement.

L'avantage du protocole colorimétrique est qu'il est possible de traiter beaucoup d'échantillons en parallèle (96 échantillons en plaque de microtitration) et qu'il est facilement automatisable. Cependant le temps de manipulation est important (minimum 5 heures pour 50 échantillons dû à la réalisation de nombreux lavages) et le kit est cher car encore peu utilisé. Une amélioration pourrait constituer à réaliser la totalité de la détection en microplaques et d'utiliser des pipettes multicanaux pour limiter le nombre de pipetages, qui est réellement le facteur limitant de cette technique.

La détection par électrophorèse permet d'avoir les résultats de la N-PCR en une journée ce qui est impossible avec la détection colorimétrique. De plus le fait de séparer les bandes par leur taille permet de détecter une éventuelle amplification non spécifique vérifiable par hybridation par la technique de Southern, ce que ne permet pas la détection colorimétrique.

La sensibilité de la PCR est limitée le plus souvent par l'efficacité avec laquelle la séquence cible est extraite de l'échantillon à analyser (KAPPERUD *et al.*, 1993). Des étapes d'extraction de l'ADN sont souvent utilisées pour contrecarrer ce problème.

Les résultats de la détection de *X.c.c* à partir d'une culture pure montrent que l'amplification spécifique de la séquence cible s'avère efficace même en partant de bactéries intactes. La présence de triton X100 dans le tampon de Barry et l'application d'une température élevée suffisent à lyser les cellules bactériennes et à libérer la séquence cible.

Nous avons montré que la détection de *X.c.c* est inhibée par les extraits de clémentinier et de tangelo, qui sont tous deux des hybrides de mandarinier. Ceci confirme les résultats obtenus par ROSSEN *et al.* (1992) qui ont montré que la PCR ne peut être réalisée directement à partir d'extraits de plante à cause bien souvent de la présence de composés inhibiteurs de la *Taq* ADN polymérase.

La présence d'hydroxyde de cuivre, principal agent chimique de lutte contre le CBA et contre de nombreuses autres phytobactérioses, inhibe l'amplification même à des concentrations inférieures à celles utilisées en vergers et en pépinières.

Il paraît donc indispensable en vue d'utiliser la PCR en routine de mettre au point des techniques de purification des échantillons avant amplification afin d'éliminer tous agents affectant l'efficacité de l'amplification.

Les techniques suivantes sont envisagées pour faire face à ce problème :

- L'immunocapture-PCR (IC-PCR) basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques coâtés sur un support solide ou magnétique. Ces anticorps permettent d'une part de purifier les bactéries et d'autre part de les concentrer. Cette technique utilisée pour la détection de *Spiroplasma citri* permet de détecter 2×10^3 spiroplasmes par ml d'extrait d'agrumes. Son seuil de détection est 10 fois supérieure à celui obtenu en PCR ; 50 fois supérieure à celui obtenu en hybridation moléculaire (SAILLARD *et al.*, 1994). On peut donc penser qu'en couplant cette technique de purification à la N-PCR on augmentera la sensibilité de détection de *X.c.c*.

L'efficacité de l'immunocapture repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques. C'est l'anticorps monoclonal A1 spécifique des souches de pathotype A de *X.c.c* qui pourrait être utilisé pour cette étude. Il faut cependant rappeler que cet anticorps ne réagit pas avec les souches originaires du Moyen Orient (VERNIERE *et al.*, 1994). Le fait d'utiliser l'anticorps monoclonal A1 pourrait donc entraîner l'apparition de fausses réactions négatives.

- La filtration des extraits d'agrumes suivie par la détection des bactéries par N-PCR en utilisant le filtre comme cible. Les sels de cuivre sont en solution dans les broyats et ne devraient pas être retenus par les pores de la membrane de filtration.

- La culture des extraits sur milieu gélosé semisélectif suivie de la N-PCR après lavage des boîtes ou comme variante la dilution des extraits réalisée dans le cadre d'un enrichissement préalable des bactéries en bouillon sélectif.

>

La principale contrainte pour obtenir des résultats quantitatifs par PCR est le processus d'amplification lui-même. L'amplification est un processus exponentiel (au moins au début) si bien que des différences minimales concernant n'importe quelle variable contrôlant le taux de la réaction affectera de façon importante le taux des produits de PCR. Les variables qui influencent le taux de la PCR incluent les concentrations de la *Taq* ADN polymérase, des dNTPs, du magnésium, de l'ADN cible et des amorces. De la même façon, la température de dénaturation, de fixation, d'élongation, le nombre et la durée des cycles, la présence d'ADN contaminant sont des facteurs à prendre en considération.

Même si tous ces paramètres sont contrôlés précisément, il y a parfois des variations d'un tube à un autre qui empêchent de quantifier de façon sûre (GILLILAND *et al.*, 1990).

Nous décrivons ici une technique qui élimine ces problèmes et qui permet une quantification précise dans des conditions où l'amplification a atteint son plateau. La détection colorimétrique des produits d'amplification de *X.c.c* a en effet montré que dans nos conditions expérimentales (35 cycles pour CITRI 1 et 20 cycles pour CITRI 2), on se situe dans des conditions de saturation.

La stratégie implique une co-amplification d'un échantillon compétiteur (A31) qui utilise les mêmes amorces que l'ADN cible mais qui peut être distingué de celui-ci après amplification par sa taille.

Cette méthode permet une simplification considérable du procédé de quantification par rapport aux techniques basées sur l'analyse des produits d'amplification durant la phase exponentielle de la réaction qui exigent une standardisation draconienne des conditions opératoires employées (LANDGRAF *et al.*, 1991).

Par comparaison avec les techniques de quantification existantes (fluorimétrie pour l'ADN, spectrophotométrie et dénombrements sur boîte pour les bactéries), nous pouvons valider le protocole mis au point. Malgré la précision des valeurs obtenues par cette technique, la N-PCR quantitative reste une technique de quantification approximative. Ce manque de précision est lié à la détection colorimétrique des produits d'amplification qui est une technique lourde et soumise à des facteurs de variation (homogénéité des billes, influence des nombreux lavages...).

L'utilisation en routine de cette technique est compromise par la lourdeur du protocole. En effet, la quantification de chaque échantillon se fait à l'aide d'au moins 8 concentrations connues en A31. Ainsi pour chaque expérience il faut multiplier par 8 ou plus le nombre de tubes à soumettre à l'amplification. Ces tubes seront ensuite soumis à la détection colorimétrique dont la réalisation est assez laborieuse.

La N-PCR quantitative a l'aptitude à détecter et quantifier des souches de *X.c.c* vivantes, vivantes mais non cultivables, et mortes dans ou sur des tissus d'agrumes ou dans l'eau de pluie ou de rosée. Cette technique permettrait par exemple d'étudier la phase épiphyte de la bactérie en quantifiant la nombre totale de cellules (mortes et vivantes) sur les tissus végétaux. Ces données pourraient être comparées avec le nombre de cellules cultivables déterminé par mise en culture, et par les populations de bactéries viables (mais pas forcément cultivables) déterminé par la technique acide nalidixique/observation microscopique après coloration par l'acridine orange (JOSEPHSON *et al.*, 1993). On pourrait ainsi mieux appréhender la qualité de l'inoculum épiphyte de *X.c.c*, mieux comprendre pourquoi il existe tant de variations dans la dynamique de ces populations épiphytes, ce qui permettrait probablement de mieux cerner l'importance de cette phase dans le cycle biologique de cet agent pathogène.

Cette étude nous a permis de comparer notre technique de détection avec la technique classique de mise en culture des bactéries sur milieu gélosé sélectif. Il s'avère que la détection par culture est plus sensible que la N-PCR. Par culture de l'eau prélevée sur les feuilles des plants sains nous avons pu mettre en évidence l'effet de dissémination de *X.c.c* par la pluie forte. La présence de la bactérie même en faible quantité a été détectée sur tous les plants sains. Le seuil de détection de cette technique dans notre expérience est de 10^1 bactérie/ml ce qui est largement supérieure à la limite de sensibilité de la N-PCR estimé à 10^3 à 10^4 bactéries/ml. La présence de *X.c.c* sur tous les plants sains n'a pas été détectée par N-PCR même après 72 heures d'enrichissement de l'échantillon de départ dans du bouillon semi-sélectif. Une similitude de 52 % a été obtenue dans ce cas.

Au vu des populations présentes en tant qu'épiphytes sur les agrumes, la détection de *X.c.c* par N-PCR à partir de matériel végétal ne présentant pas de symptômes est compromise par son manque de sensibilité. Des étapes d'enrichissement de l'échantillon de départ constituent une solution envisageable pour une utilisation de la N-PCR dans le cadre d'étude d'écologie microbienne. Cependant, ces étapes augmentent le temps de réponse de la technique. La sensibilité et l'efficacité de la technique pourraient être améliorée en utilisant une étape de concentration des bactéries. Les différents moyens envisageables sont les mêmes que ceux qui permettraient de s'affranchir de la présence d'éventuels agents inhibiteurs. Ils ont déjà été passés en revue précédemment.

La comparaison des 2 techniques de détection (PCR et culture) a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Toutes montrent un degré de similitude supérieure à celui déterminé par notre expérience. la détection d'*Helicobacter pylori* par PCR et par culture montre une concordance de 97 % entre les 2 techniques (VAN ZWET *et al.*, 1993). L'étude de la détection du spirochète *Borrelia burgdorferi* a montré une similitude entre les 2 tests de 72 %. Dans cet exemple, la PCR reste moins sensible que la culture à cause de la présence d'agents inhibiteurs dans l'échantillons de

départ (PACHNER *et al.*, 1993). Nos travaux démontrent qu'il y a nécessité à optimiser le protocole d'enrichissement. Cette mise au point méthodologique devrait très certainement permettre d'augmenter de façon importante la similitude des résultats obtenus par culture et par N-PCR.

Notre étude et d'autres (MONIER, 1992 ; BUREAU, 1993) ont permis de montrer que la culture sur milieu sélectif n'évite pas la croissance d'autres bactéries qui peuvent gêner la détection de *X.c.c.* De plus, il est impératif d'avoir recours à des tests d'identification des colonies suspectées être *X.c.c.* si on veut aboutir à un diagnostic sans aucun équivoque, ce qui augmente considérablement le temps de réponse de la technique. La spécificité de la N-PCR constitue alors un avantage certain sur la mise en culture.

De façon générale, la technique de détection par mise en culture reste plus sensible que les tests PCR mis au point. La détection de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* par PCR et par culture montre que la PCR est plus sensible que l'isolement uniquement dans le cas où l'échantillon de départ est riche en bactéries autres que la cible du test PCR. La grande spécificité de la technique permet de s'affranchir de la présence d'une population bactérienne parasite (TOURTE, 1993).

Il faut noter que la PCR est également plus sensible que la culture dans le cas de microorganismes impossibles ou difficiles à cultiver. La détection par N-PCR de leptospires s'avère plus sensible que la détection par culture. Cette différence est liée à la difficulté de cultiver les leptospires sur milieu gélosé (GRAVEKAMP *et al.*, 1993). Il en est de même pour la détection de *Xylella fastidiosa* qui cause au Brésil une grave maladie des agrumes appelée "Citrus variegated chlorosis" ou CVC (HARTUNG *et al.*, 1994 ; MINSAVAGE *et al.*, 1994).

Les résultats de la N-PCR quantitative appliquée à l'estimation de populations bactériennes présentes dans les symptômes foliaires de chancre bactérien des agrumes valident l'efficacité du protocole mis au point. Les valeurs obtenues par N-PCR quantitative sont supérieures à celles déterminées par comptage sur milieu semi-sélectif. Cette observation, déjà faite lors de la mise au point de la N-PCR sur des concentrations connues en bactéries, peut s'expliquer par le fait que la N-PCR détecte les cellules mortes et vivantes dans les symptômes.

Comme il a été expliqué précédemment, il faut rappeler que l'utilisation de la N-PCR quantitative dans le cadre d'études d'écologie microbienne, où le nombre d'échantillons est important, est impossible du fait de la lourdeur de la technique.

La N-PCR est cependant une technique de détection plus rapide que l'isolement qui doit être suivi par des tests d'identification. Une solution envisageable serait de coupler la culture qui permettrait de quantifier la population bactérienne avec la N-PCR qui identifierait de façon spécifique la bactérie cible à partir des colonies isolées. Dans le cadre d'études portant sur un grand nombre d'échantillons cette solution est irréalisable.

CONCLUSION

La N-PCR mise au point et optimisée dans cette étude constitue une méthode de détection de *X.c.c* sensible et spécifique. La sensibilité de cette technique est de 10^3 à 10^4 bactéries/ml ce qui est supérieur au seuil de détection de la PCR en une étape, de l'hybridation par des sondes chaudes ou froides et de l'ELISA.

La combinaison des critères de sensibilité, de spécificité et de rapidité font de la N-PCR une technique de diagnostic de choix par rapport aux techniques plus sensibles ou de sensibilité équivalente que sont l'isolement sur milieu gélosé et l'immunofluorescence indirecte.

Nous avons montré que le dénombrement de molécules cibles est réalisable par N-PCR quantitative. Elle génère des résultats proches de ceux obtenus par d'autres techniques de quantification existantes. Cependant la durée et la lourdeur de cette technique la rendent inutilisable en routine. Le dénombrement par isolement sur milieu gélosé reste donc la meilleure technique de quantification des bactéries pour des travaux d'écologie microbienne et d'épidémiologie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALIZADEH A., et RAHIMIAN H.. 1990. Citrus canker in Kerman province. *Iran J. Plant Pathol.* **26** (1/4): 42.
- ALVAREZ A. M., BENEDICT A. A., MIZUMOTO C. Y., POLLARD L. W. et CIVEROLO E. L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* **81** (8): 857-865.
- Anonyme 1990. Méthode de quarantaine. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, méthodes d'inspection, de test et d'enquête. *Bull. OEPP* **20**: 263-272.
- Anonyme 1993. Fruits et légumes frais à la Réunion: évolution des importations de 1989 à 1992, réflexion sur la production et la consommation. Chambre d'Agriculture de la Réunion-SUAD, Saint Denis, 78 p.
- AUBERT B., LUISETTI J., CIVEROLO E. L., CADET T. et LAVILLE E. 1982. Le chancre citrique à l'île de la Réunion. *Fruits* **37** (11): 705-722.
- BARNES E. A. 1988. Citrus canker a major headache for cal poly pomona's project in the Yemen Arab Republic. *California Grower* **12** (4): 12-13 ; 38-39 ; 41.
- BIRNBOIM H. C. et DOLY J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
- BARRY T., COLLERAN G., CLENNON M., DUNICAN L. K., et GANNON F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* **1**: 51-52.
- BRADBURY J. F. 1986. "*Xanthomonas* DOWSON 1939, 187", 198-260, In guide to plant pathogenic bacteria. CAB International, Farnham Royal, U.K., 329 p.
- BROADBENT, P. 1992. Perceived vulnerability of citrus to canker in the major citrus growing areas of Australia. *Australas. Plant Pathol.* **21** (4): 158-162.
- BRUN J. 1971. Le chancre bactérien des *Citrus*. *Fruits* **26** (7/8): 533-540.
- BUREAU S. 1993. Contribution à l'étude de la répartition de deux populations de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* à la Réunion présentant différents niveaux de résistance à plusieurs antibiotiques de la famille des β -lactamines, mémoire de Maîtrise, Université de la Réunion, 21p.
- CASSIN, P. J. 1984. Comportement des variétés d'agrumes dans les différentes régions de production. *Fruits* **39** (4): 263-276.
- CIVEROLO E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. *J. Rio Grande Val. Hort. Soc.* **37**: 127-145.
- CIVEROLO E. L. et FAN F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* **66** (3): 231-236.
- CIVEROLO E. L. et STAPLETON J. J. 1984. Epidemiology of *Xanthomonas* associated with citrus. *II Symposium sobre la agroindustria del limon mexicano*, Tecoman, 14-16 mayo 1984, 295-310.

- DYE D. W., BRADBURY J. F., GOTO M., HAYWARD A. C., LELLIOTT R. A. et SCHROTH M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* **59** (4): 153-168.
- EL GOORANI M. A. 1989. The occurrence of citrus canker disease in United Arab Emirates (U. A. E.). *J. Phytopathol.* **125** (3): 257-264.
- GABRIEL D. W., HUNTER J. E., KINGSLEY M. T., MILLER J. W. et LAZO G. R. 1988. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1** (2): 59-65.
- GABRIEL D. W., KINGSLEY M. T., HUNTER J. E. et GOTTWALD T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** (1): 14-22.
- GILLILAND G., PERRIN S., et BUNN H. F. 1990. Competitive PCR for quantification of mRNA, 60-69, In PCR protocols. A guide to Methods and Applications, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White eds., Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovitch Pubs., San Diego New York Boston London Sidney Tokyo Toronto, 482 p.
- GOTO M. 1962. Studies on citrus canker. *Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ.* **12**: 70-72 (abstract).
- GOTO M., OHTA K. et OKABE N. 1975. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. 1. Detection of the bacterium from a grass (*Zoysia japonica*). *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* **41** (1): 9-14.
- GOTTWALD T. R., GRAHAM J. H. et EGEL D. S. 1992. Analysis of foci of Asiatic citrus canker in a Florida citrus orchard. *Plant Dis.* **76** (4): 389-396.
- GRAHAM J. H., GOTTWALD T. R., CIVEROLO E. L. et Mc. GUIRE R. G. 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Dis.* **73** (5): 423-427.
- GRAHAM J. H., GOTTWALD T. R., RILEY T. D. et ACHOR D. 1992 Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology* **82** (11): 1319-1325.
- GRAVEKAMP C., VANDEKEMP H., FRANZEN M., CARRINGTON D., SCHOONE G. J., VANEYS G. J. J., EVERARD C. O. R., HARTSKEERL R. A., et TERPSTRA W. J. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* **139** (8): 1691-1700.
- HARTUNG J. S., BERETTA J., BRLANSKY R. H., SPISSO J., et LEE R. F. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium : axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84** (6):591-597.
- HARTUNG J. S., et CIVEROLO E. L. 1987. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida. *Phytopathology* **77** (2): 282-285.
- HARTUNG J. S., et CIVEROLO E. L. 1989. Restriction fragment length polymorphism distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. *Phytopathology* **79** (7): 793-799.

- HARTUNG J. S., DANIEL J. F. et PRUVOST O. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (4): 1143-1148.
- HENSON J. M., et FRENCH R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 81-109.
- IBRAHIM G., et BAYAA B. 1989. Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries. *Arab J. Plant Prot.* **7** (2): 190-197.
- JOSEPHSON K. L., GERBA C. P., et PEPPER I. L. 1993. Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (10): 3513-3515.
- KAPPERUD G., VARDUND T., SKJERVE E., HORNES E., et MICHAELSEN T. E. 1993. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (9): 2938-2944.
- KOIZUMI M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bull. Hort. Res. Sta. Jpn.* **11**: 167-183.
- KOIZUMI M. 1972. Studies on the symptoms of citrus canker formed on satsuma mandarin fruit and existence of causal bacteria in the affected tissues. *Bull. Hort. Res. Sta. Jpn.* **12**: 229-243.
- KOIZUMI M. 1976. Incubation period of citrus canker in relation to temperature. *Bull. Fruit Tree Res. Sta. Jpn.* **3**: 46. (abstract).
- KOIZUMI M. 1977. Factors related to the occurrence of spring canker caused by *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON. *Bull. Fruit Tree Res. Sta. Jpn.* **4**: 126 (abstract).
- KOIZUMI M. 1983. Relationship between wound-healing process of citrus leaf tissues and successful infection through wounds by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* **49** (3): 352-360.
- KOIZUMI M. 1985. "Citrus canker: the world situation, 2-7", in Citrus canker: an international perspective. L. W. Timmer ed., IFAS, University of Florida, Lake Alfred: 2-7.
- KUHARA S. 1978. Present epidemic status and control of the citrus canker disease (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) in Japan. *Rev. Plant Prot. Res.* **11**: 132-142.
- KWOK S. 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over. 142-145. In PCR protocols. A guide to Methods and Applications, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White eds., Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovitch Publs., San Diego New York Boston London Sidney Tokyo Toronto, 482 p.
- LANDGRAF A., RECKMANN B., et PINGOUD A. 1991. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal. Biochem.* **198**: 86-91.
- LAVILLE J. 1985. Étude de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915) DYE1978 isolées de l'île de la Réunion. Caractères bactériologiques. Comportement épiphyte. Pouvoir pathogène. *Fruits* **40** (11): 719-738.

- LEBEN C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **3**: 209-230.
- MAHONY J. B., LUINSTRA K. E., SELLORS J. W., et CHERNESKY M. A. 1993. Comparison of plasmid based and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **31** (7): 1753-1758.
- MINSAVAGE G. V., THOMPSON C. M., HOPKINS D. L., LEITE R. M. V. B. C., et STALL R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, **84** (5): 456-461.
- MIYAZAKI Y., KOGA H., KOHNO S., et KAKU M. 1993. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **31** (8): 2228-2232.
- MONIER, L. 1992. Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes. mémoire de fin d'études, ENITHP, Angers, France, 68 p.
- OTA T. 1983. Interactions in vitro and in vivo between *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and antagonistic *Pseudomonas* sp. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* **49** (3), 308-315.
- PACHNER A. R., RICALTON N., et DELANEY E.. 1993. Comparison of polymerase chain reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **31** (2): 208-214.
- PANNETIER C., COCHET M., DARCHE S., et KOURILSKY P.. 1992. A quantitative method for the titration of nucleic acids by enzymatic amplification (PCR) run to saturation. *C. R. Acad. Sci. Paris* **315** (7): 271-277.
- PRUVOST O., HARTUNG J. S., CIVEROLO E. L., DUBOIS C. et PERRIER X. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology* **82** (4): 485-490.
- PRUVOST O., VERNIERE C., BENOIST C., BREHERET S.; COUTEAU A. et LUISETTI J. 1994. Mise en évidence d'une multi-résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamine chez les souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolées dans l'archipel des Mascareignes. Premières rencontres de phytobactériologie, Aussois, France: 3.
- RASMUSSEN O. F., et REEVES J. C. 1992. DNA probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *J. Biotechnol.* **25** (3): 203-220.
- ROISTACHER C. N., et CIVEROLO E. L. 1989. Citrus bacterial canker disease of lime trees in the Maldive Islands. *Plant Dis.* **73** (4): 363-367.
- ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTROM K., et RASMUSSEN O. F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17** (1): 37-45.
- ROSSETTI V. 1981. Identificação do cancro citrico. *Biologico Sao Paulo* **47** (5): 145-153.

- RUDOLPH K., ROY M. A., SASSER M., STEAD D. E., DAVIS M., SWINGS J. et GOSSELE F., 1990. Isolation of bacteria, 43-94. In : Methods in phyto bacteriology, Z. Klement, K. Rudolph, & D. C. Sands eds., Akadémiai Kiado publs., Budapest, 568 p.
- SAILLARD C., BARTHE C., RENAUDIN J, et BOVE J.M. 1994. Immunocapture-PCR pour la détection de *Spiroplasma citri* : un mollicute phytopathogène. Premières rencontres de phytobactériologie, Aussois, France : 23.
- SERIZAWA S. 1981. Recent studies on the behavior of the causal bacterium of the citrus canker. *Proc. Int. Soc. Citriculture* **1**: 395-397.
- SERIZAWA S., et INOUE K. 1976. Studies on citrus canker. III. The influence of wind on infection. *Bull. Shizuoka Citrus Exp. Sta.* **11**: 65-66 (abstract).
- SIEBERT P. D., et LARRICK J. W. 1993. PCR MIMICS : competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* **14** (2): 244-249.
- STALL R. E., MILLER J. W, et CANTEROS de ECHENIQUE B. I. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **93**: 10-14.
- STALL R. E., MILLER J. W, MARCO G. M., et CANTEROS de ECHENIQUE B. I. 1981. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. *Proc. Int. Soc. Citriculture* **1**: 414-417.
- STEFFAN R. J., et ATLAS R. M. 1991. Polymerase chain reaction : applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 137-161.
- TIMMER L. W. 1989. Inoculum production from asiatic citrus canker lesions and epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Argentina. *Phytopathology* **79** (10): 1182.
- TIMMER L. W., GOTTWALD T. R., et ZITKO S. E. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* **75** (2): 192-195.
- TOURTE C., 1993. Épidémiologie de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* et mise au point de la PCR pour sa détection. Thèse de Doctorat d'Université, Université de LYON I, 110 p.
- VAN ZWET A. A., THIJS J. C., KOOISTRAMID A. M. D., SCHIRM J., et SNIJDER J. A. M. 1993. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.* **31** (7): 1918-1920.
- VERNIERE, C. 1992. Le chancre bactérien des agrumes (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) : étude épidémiologique et écologique dans le cadre de l'île de la Réunion. Thèse de Doctorat d'Université. Université de Paris Sud-Orsay, 140 p.
- VERNIERE C., DEVAUX M., PRUVOST O., COUTEAU A., et LUISETTI J. 1991. Étude de la variabilité biochimique et physiologique de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes. *Fruits* **46** (2): 153-161.
- VERNIERE C., PRUVOST O., CIVEROLO E. L., HARTUNG J. S., et MAESTRI P. 1994. Caractérisation de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* développant un pouvoir pathogène atypique. Premières rencontres de phytobactériologie, Aussois, France : 5.

- VERNIERE C., PRUVOST O., COUTEAU A., et LUISETTI J. 1992 (a). Données sur la biologie et l'épidémiologie de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes - exemple de l'île de la Réunion. *Fruits* **47**: 164-168.
- VERNIERE C., PRUVOST O., LUISETTI J., DEVAUX M. et COUTEAU A. 1992 (b). Techniques d'identification des pathotypes de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes. *Fruits* **47**: 169-173.
- WILSON M., et LINDOW S. E. 1992. Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (12): 3908-3913.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture et tampons utilisés.

Bouillon nutritif :

bouillon nutritif	8 g
eau distillée	1000 ml
	pH 6,8

Milieu LPGAT :

extrait de levure	7 g
pastone	7g
glucose	7 g
agar	15 g
tilt (antifongique)	40 µl
eau distillée	1000 ml
	pH 7,2

Milieu LPGATS :

Au milieu LPGAT, on ajoute :

streptomycine	50 mg/l
---------------	---------

Bouillon SPKCA :

saccharose	20 g
pastone	5 g
K ₂ HPO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25 g
eau distillée	1000 ml
kasugamycine	0,01 g
céphalexine	0,01 g
ampicilline	0,025 g
	pH 7,3

Milieu SPATKCA :

saccharose	20 g
pastone	5 g
K ₂ HPO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25 g
agar	15 g
eau distillée	1000 ml
kasugamycine	0,01 g
céphalexine	0,01 g
ampicilline	0,025 g
tilt	40 µl
	pH 7,3

Milieu SPAT :

saccharose	20 g
pastone	5 g

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25 g
agar	15 g
eau distillée	1000 ml
	pH 7,3

Les milieux sont autoclavés pendant 20 minutes à 120° C. Avant distribution en boîtes de Pétri ou en tubes, les antibiotiques et antifongiques sont ajoutés.

Tampon tris HCl 0,01M :

1,211 g de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (tampon Sigma 7-9)
 1000 ml d'eau distillée
 HCl 1 M (pH 7,2)

Tampon TE :

10 mmol de tris
 1 mmol d'EDTA
 1000 ml d'eau distillée
 pH 8,0

Tampon TAE (tris-acétate-EDTA) 50 X :

242 g de tris
 57,1 ml d'acide acétique glacial
 100 ml d'EDTA (0,5 M pH 8,0)

Annexe 2 : Mesure de concentration d'ADN à l'aide du fluorimètre HOFFER.

Le fluorimètre TKO 100 est un fluorimètre à longueur d'onde fixe spécialement conçu pour la quantification de faibles concentrations en ADN (0,1 à 100 ng/μl).

Le principe de la méthode est basé sur la fixation sur l'ADN du bis-benzimidazole plus connu sous le nom de colorant de Hoechst.

En absence d'ADN, le pic d'excitation du colorant se situe à 356 nm et le pic d'émission à 492 nm. Lorsque le colorant se fixe à l'ADN, les pics d'excitation et d'émission se situent respectivement à 365 nm et 458 nm.

Protocole expérimental :

Placer 3 μl de solution à mesurer sur du parafilm, ajouter 3 μl de solution de coloration. Faire monter dans un capillaire, placer le dans l'appareil et mesurer.

La solution de coloration est composée de :

100 μl de TNE 10/200/1 mM (tris-NaCl-EDTA) 10 x pH 7,4
2 μl de colorant de Hoechst conservé à l'abri de la lumière
898 μl d'eau

Le blanc est réalisé avec du TE 10/1 mM (tris-EDTA). On réalise une courbe étalon à l'aide d'une série de concentrations connues d'ADN de thymus de veau (0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 50 ; 100 ng/μl).

La fluorescence du colorant en présence d'ADN dépend du contenu en A-T. En effet, il se fixe uniquement sur ces bases. L'ADN de thymus de veau contient environ 40 % de G-C (soit 60 % A-T) comme la plupart des cellules animales et végétales. Le contenu en A-T de l'ADN bactérien varie selon les espèces. L'ADN de *Xanthomonas* contient 60 % de G-C soit 40 % d'A-T. On multipliera donc les valeurs de fluorescence obtenues par 1,5 (60/40).

Annexe 3 : Protocoles de la N-PCR.

PCR *X. c. pv. citri* à partir d'ADN purifié

Les manipulations doivent être réalisées dans la hotte à flux laminaire horizontal. S'assurer que les UV ont été mis en marche au moins 30 minutes avant utilisation de la hotte.

Tous les composants doivent être pipetés avec les micropipettes "spécial PCR" (scotch rouge) et ne doivent être utilisés que des embouts spéciaux à filtre. Un embout ne sert qu'une fois ! Attention aux contaminations ! Jamais plus d'un seul tube à la fois ouvert dans la hotte !

- L'eau ultra pure est aliquotée en eppendorfs 1,5ml (remplis) et est autoclavée [120°C 20'] (eups). Elle se stocke au réfrigérateur.
- L'huile minérale est aliquotée en eppendorfs 1,5ml (remplis) et est autoclavée 3 fois [120°C 20']. Elle se stocke au réfrigérateur.
- Le tampon de Barry 10x est aliquoté en eppendorfs 1,5ml (200µl par tube) et est autoclavé [120°C 20']. Il se stocke au réfrigérateur.

1 première PCR

1.1 préparation du mix

par échantillon... (prévoir 10 % d'échantillons en plus que nécessaire)

eups	19,9µl
tampon de Barry 10x	2,5µl
dNTPs	0,3125µl de chaque (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
amorce 4	0,125µl
amorce 7	0,125µl
<i>Taq</i> DNA polymerase	0,1µl

Répartir dans les eppendorfs 0,65ml à raison de 24µl par tube. Mettre les tubes sur glace. Ajouter ensuite 2 gouttes d'huile minérale stérile (autoclavée 3 fois). Sortir les tubes. Remettre les réactifs soit au réfrigérateur (eups, huile, tampon de Barry), soit au congélateur (dNTPs, amorces, *Taq* DNA polymerase). Fermer la hotte et allumer les UV.

1.2 programme TAQ

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme TAQ pendant environ 30 minutes. Sortir les tubes et les placer sur le portoir isotherme en polystyrène.

1.3 ajout de l'ADN cible

Ajouter dans la hotte les ADN cible à raison de 1µl par tube

1.4 programme CITRI1

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme CITRI1 (durée approximative 3 heures).

2 deuxième PCR

2.1 préparation du mix

par échantillon... (prévoir 10 % d'échantillons en plus que nécessaire)

eups	19,9µl (39,8)*
tampon de Barry 10x	2,5µl (5)*
dNTPs	0,3125µl de chaque (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,625)*
amorce 494-3*	0,125µl (0,25)*
amorce 494-4*	0,125µl (0,25)*
Taq DNA polymerase	0,1µl (0,2)*

*S'il est envisagé de détecter colorimétriquement les amplifications, utiliser les amorces 494-3Bio et 494-4Lac au lieu de 494-3 et 494-4, et doubler tous les volumes de réaction.

Répartir dans les eppendorfs 0,65ml à raison de 24µl (48µl*) par tube. Mettre les tubes sur glace. Ajouter ensuite 2 gouttes d'huile minérale stérile (autoclavée 3 fois). Sortir les tubes. Remettre les réactifs soit au réfrigérateur (eups, huile, tampon de Barry), soit au congélateur (dNTPs, amorces, Taq DNA polymerase). Fermer la hotte et allumer les UV.

2.2 programme TAQ

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme TAQ pendant environ 30 minutes. Sortir les tubes et les placer sur le portoir isotherme en polystyrène.

2.3 ajout de l'ADN cible

Ajouter dans la hotte 1µl (2)* par tube du produit d'amplification de la première PCR.

*si détection colorimétrique

2.4 programme CITRI2

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme CITRI2 (durée approximative 1 heure et demie).

PCR *X. c. pv. citri* à partir de suspensions bactériennes ou d'extraits biologiques

Les manipulations doivent être réalisées dans la hotte à flux laminaire horizontal. S'assurer que les UV ont été mis en marche au moins 30 minutes avant utilisation de la hotte.

Tous les composants doivent être pipetés avec les micropipettes "spécial PCR" (scotch rouge) et ne doivent être utilisés que des embouts spéciaux à filtre. Un embout ne sert qu'une fois ! Attention aux contaminations ! Jamais plus d'un seul tube à la fois ouvert dans la hotte !

- L'eau ultra pure est aliquotée en eppendorfs 1,5ml (remplis) et est autoclavée [120°C 20'] (eups),. Elle se stocke au réfrigérateur.
- L'huile minérale est aliquotée en eppendorfs 1,5ml (remplis) et est autoclavée 3 fois [120°C 20']. Elle se stocke au réfrigérateur.
- Le tampon de Barry 10x est aliquoté en eppendorfs 1,5ml (200µl par tube) et est autoclavé [120°C 20']. Il se stocke au réfrigérateur.
- Le tampon de dilution de la *Taq* DNA polymerase est aliquoté en eppendorfs 1,5ml (100µl par tube) et est autoclavé [120°C 20']. Il se stocke au réfrigérateur.

1 première PCR

1.1 préparation du mix

par échantillon... (prévoir 10 % d'échantillons en plus que nécessaire)

eups	19µl
tampon de Barry 10x	2,5µl
dNTPs	0,3125µl de chaque (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
amorce 4	0,125µl
amorce 7	0,125µl

Répartir dans les eppendorfs 0,65ml à raison de 23µl par tube. Mettre les tubes sur glace. Ajouter ensuite 2 gouttes d'huile minérale stérile (autoclavée 3 fois). Ajouter par tube 1µl d'échantillon biologique. Sortir les tubes. Remettre les réactifs soit au réfrigérateur (eups, huile, tampon de Barry), soit au congélateur (dNTPs, amorces). Fermer la hotte et allumer les UV.

1.2 programme DENATURE

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme DENATURE pendant 10 minutes.

1.3 programme TAQ

Lancer le programme TAQ pendant environ 30 minutes. Sortir les tubes et les placer sur le portoir isotherme en polystyrène.

1.4 ajout de la *Taq* DNA polymerase

Pipetter dans la hotte 0,1µl de *Taq* DNA polymerase et 0,9 µl de tampon de dilution (D) par échantillon (prévoir 10 % en plus). Ajouter la *Taq* DNA polymerase diluée aux échantillons à raison de 1µl par tube.

1.5 programme CITRI1

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme CITRI1 (durée approximative 3 heures).

2 deuxième PCR

2.1 préparation du mix

par échantillon... (prévoir 10 % d'échantillons en plus que nécessaire)

eups	19,9µl (39,8)*
tampon de Barry 10x	2,5µl (5)*
dNTPs	0,3125µl de chaque (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,625)*
amorce 494-3*	0,125µl (0,25)*
amorce 494-4*	0,125µl (0,25)*
<i>Taq</i> DNA polymerase	0,1µl (0,2)*

*S'il est envisagé de détecter colorimétriquement les amplifications, utiliser les amorces 494-3Bio et 494-4Lac au lieu de 494-3 et 494-4, et doubler tous les volumes de réaction.

Répartir dans les eppendorfs 0,65ml à raison de 24µl (48µl*) par tube. Mettre les tubes sur glace. Ajouter ensuite 2 gouttes d'huile minérale stérile (autoclavée 3 fois). Sortir les tubes. Remettre les réactifs soit au réfrigérateur (eups, huile, tampon de Barry), soit au congélateur (dNTPs, amorces, *Taq* DNA polymerase). Fermer la hotte et allumer les UV.

2.2 programme TAQ

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme TAQ pendant environ 30 minutes. Sortir les tubes et les placer sur le portoir isotherme en polystyrène.

2.3 ajout de l'ADN cible













Ajouter dans la hotte 1µl (2)* par tube du produit d'amplification de la première PCR.

*si détection colorimétrique

2.4 programme CITRI2

Une goutte d'huile de vaseline est préalablement incorporée dans chaque puits utilisé de l'amplificateur d'ADN. Placer les tubes et lancer le programme CITRI2 (durée approximative 1 heure et demie).

**Annexe 4 : Marqueur de poids moléculaire
Boehringer Marker VI**

	2176 paires de bases
	1766
	1230
	1033
	653
	517
	453
	394
	298
	234
	220
	154

Résumé

Xanthomonas campestris pv. *citri* (X.c.c.), agent du chancre bactérien des agrumes, est un organisme de quarantaine. La lutte contre la maladie exige de disposer de techniques de détection fiables et sensibles. La N-PCR basée sur l'amplification en deux séries d'une région plasmidique hautement conservée chez X.c.c. permet de détecter de 1 à 10 copies de la séquence cible que ce soit à partir d'ADN purifié ou de cellules bactériennes intactes. L'amplification est inhibée par l'hydroxyde de cuivre, agent chimique de lutte contre la maladie et par les extraits concentrés de Clémentinier et de Tangelo. Le dénombrement des bactéries dans les symptômes foliaires est réalisable par N-PCR quantitative, protocole basé sur la coamplification de l'ADN cible avec un ADN compétiteur servant de standard de concentration. La méthode DIANA (détection des Acides Nucléiques Amplifiés et Immobilisés) permet de détecter les produits d'amplification par colorimétrie grâce à l'utilisation d'amorces marquées. Ses performances sont identiques à celles de la détection électrophorétique. L'application de la N-PCR dans le cadre d'études d'écologie microbienne montre que la culture sur milieux gélosés sélectifs est plus sensible que la N-PCR. Cependant, elle doit être suivie par des tests d'identification qui augmentent la durée et le coût de la technique par rapport à la N-PCR.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *citri* is the causal agent of citrus bacterial canker and is a quarantine pathogen. Reliable and sensitive detection methods are needed to control the disease. A method of N-PCR using two rounds of amplification of a plasmid sequence which is highly conserved among X.c.c. allows to detect 1 to 10 copies of the target sequence either in purified DNA or in bacterial cells. Copper hydroxide, the main chemical used to control the disease and concentrated extracts from Tangelo or Tangerine cause inhibition of the amplification. Numeration of bacterial populations from leaf lesions was made possible by quantitative N-PCR. This method is based on the coamplification of the target DNA with a competitor DNA. Amplification products are detected using the colorimetric DIANA kit (Detection of Immobilized Amplified Nucleic Acids) with labeled PCR primers. This method is as efficient as electrophoretic detection.

When used for microbial ecology studies, N-PCR was less sensitive than culture on selective media though less time and money consuming.